

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS
PROTEICOS INHIBIDORES DE TRIPSINA PROVENIENTES DE SEMILLAS
DE SANGORACHE (*Amaranthus hybridus* L.)”**

AUTORAS

GABRIELA OTILIA JÁCOME BENAVIDES

DIANA ESTEFANÍA PAUCAR HIDALGO

TUTORA

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Quito, junio del 2019

Declaratoria de Coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos inhibidores de tripsina provenientes de semillas de sangorache (*Amaranthus hybridus* L.)” realizado por Gabriela Otilia Jácome Benavides y Diana Estefanía Paucar Hidalgo, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.



Laura Elizabeth Huachi Espín

C.I:1711113744

Quito, junio 2019

Cesión de derechos de autor

Nosotras Gabriela Otilia Jácome Benavides y Diana Estefanía Paucar Hidalgo con documento de identificación 0202098000 y 1722079744 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos Patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo titulado “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos inhibidores de tripsina provenientes de semillas de sangorache (*Amaranthus hybridus* L.)” mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de propiedad intelectual, en condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Gabriela Otilia Jácome Benavides

0202098000

Diana Estefanía Paucar Hidalgo

1722079744

Quito, junio del 2019

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis padres por todo el amor que me han brindado, sus buenos consejos y su confianza.

A mis hermanos por su paciencia, cariño y cuidados.

Gabriela

A mis padres Marcelo y Angelita quienes, con su amor incondicional, paciencia, esfuerzo y motivación me han permitido cumplir hoy una meta más, gracias por todas sus enseñanzas y valores inculcados.

A mis hermanos y primos, con quienes he compartido tantas alegrías, gracias por estar conmigo siempre y brindarme su apoyo en todo momento.

A la memoria de mi abuelito José Hidalgo, porque sé que desde el cielo me seguirá cuidando y guiando.

Diana

Agradecimientos

A los técnicos y tesistas del laboratorio, de Ciencias Nucleares de la facultad de Ingeniería Química y Agroindustria de la Escuela Politécnica Nacional por habernos integrado a su equipo de trabajo con todo el cariño.

A los ingenieros Patricio Castillo. PhD, Marco Sinche y Gonzalo Jácome por darnos la oportunidad de trabajar en un proyecto conjunto con tan prestigiosa institución.

A los técnicos del laboratorio Ciencias de la Vida por su acompañamiento en el desarrollo de esta investigación.

A nuestra directora de tesis Laurita por su apoyo, su buena predisposición para trabajar, también por su confianza y por ofrecernos su amistad incondicional.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	5
Marco teórico	5
1.1 Proteínas	5
1.1.1 Importancia de las proteínas	6
1.2 Enzimas	6
1.2.1 Importancia de las enzimas	7
1.3 Factores que afectan la actividad enzimática	7
1.3.1 pH	7
1.3.2 Temperatura	7
1.3.3 Concentración de sustrato	8
1.4 Clasificación de las enzimas	8
1.4.1 Proteasas	9
1.4.1.1 Clasificación de las proteasas	10
1.5 Tripsina	11
1.6 Inhibidores de proteasas (IPs)	11
1.6.1 Mecanismos de acción de los IPs	12

1.6.2 Fuentes de inhibidores de proteasas (IPs).....	12
1.6.3 Inhibidores de Tripsina	13
1.6.4 Inmovilización enzimática	14
1.6.5 Cromatografía de afinidad	15
1.7 Sangorache (<i>Amaranthus hybridus L.</i>)	15
1.7.1 Importancia y aplicaciones del sangorache	16
1.8 Actividad antimicrobiana	17
1.8.1 Péptidos antimicrobianos.....	18
1.9 Bacterias en estudio patógenos oportunistas	19
1.9.1 <i>Escherichia coli</i>	19
1.9.2 <i>Micrococcus luteus</i>	20
1.9.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
1.9.4 <i>Serratia marcescens</i>	21
1.9.5 <i>Streptococcus</i> grupo C y G	22
1.10 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	22
1.11 Difusión de discos (Método M02).....	23
Capítulo	24
Metodología	24
2.1 Obtención de los extractos proteicos	24
2.1.1 Extracción de grasa de la harina de semillas de sangorache.....	24

2.1.2 Preparación del extracto crudo de semillas de sangorache	24
2.1.3 Preparación de extracto semipurificado de semillas de sangorache	24
2.1.4 Preparación de extracto purificado de semillas de sangorache.....	25
2.1.4.1 Obtención de la matriz glioxil–sepharosa	25
2.1.4.2 Preparación de la matriz tripsina -glioxil –sepharosa	25
2.1.4.3 Purificación de inhibidores de tripsina mediante cromatografía de afinidad	26
2.1.5 Liofilización de los extractos crudo, semipurificado y purificado de semillas de sangorache.	27
2.1.6 Reconstitución de extractos de semillas de sangorache.....	27
2.2 Caracterización de los extractos con actividad inhibidora sobre tripsina	27
2.2.1 Evaluación de la actividad proteolítica de Tripsina.....	27
2.2.2 Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos.....	28
2.2.3 Determinación de la concentración proteica de los extractos	29
2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos provenientes de las semillas de tripsina	30
2.3.1 Cepas en estudio	30
2.3.2 Tinción Gram	31
2.3.3 Viabilidad de las cepas de microorganismos mediante Turbidimetría	31
2.3.4 Preparación de la escala Mac Farland 0,5.....	32

2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos	32
2.4.1 Técnica de difusión de disco en agar	32
2.5 Diseño Experimental	34
Capítulo 3	36
Resultados y discusión	36
3.1 Obtención de los extractos proteicos	36
3.2 Evaluación de la actividad proteolítica de tripsina.....	36
3.3 Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos frente a tripsina	37
3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos provenientes de las semillas de sangorache con capacidad inhibidora frente a tripsina	39
Conclusiones	57
Recomendaciones.....	59
Glosario	60
Abreviaturas	62
Referencias	63
Anexos	75

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las enzimas de acuerdo con la reacción catalizada.....	9
Tabla 2. Principales características de las cuatro clases de proteasas.....	10
Tabla 3. Descripción de los mecanismos de inhibición enzimática.....	12
Tabla 4. Código de certificación de las bacterias empleadas en el estudio.....	31
Tabla 5. Tratamientos del ensayo de evaluación de la actividad antimicrobiana	35
Tabla 6. Actividad enzimática y actividad inhibitoria de los extractos proteicos de semillas de sangorache	37
Tabla 7. Tamaño de halos de inhibición de bacterias patógenas frente al extracto crudo	41
Tabla 8. Tamaño de halos de inhibición de bacterias patógenas frente al extracto semipurificado.....	43
Tabla 9. Tamaño de halos de inhibición de bacterias patógenas frente al extracto purificado	46
Tabla 10. Cuadro de Análisis de Varianza de la prueba de sensibilidad	51
Tabla 11. Prueba de comparación Tukey de los halos observados en cada bacteria	52
Tabla 12. Comparación estadística de la actividad antimicrobiana utilizando prueba Tukey	53
Tabla 13. Categorización de la actividad antimicrobiana de forma cualitativa para las bacterias del estudio	55

Índice de figuras

Figura 1. Inhibición de la enzima al interferir en el complejo enzima sustrato.	13
Figura 2. Prueba de difusión de discos.....	33
Figura 3. Extractos proteicos.....	36
Figura 4. Halos de inhibición formados por el extracto semipurificado en <i>E. coli</i>	44
Figura 5. Halos de inhibición formados por el extracto semipurificado en <i>S. marcescens</i>	45
Figura 6. Halos de inhibición formados por el extracto purificado en <i>Streptococcus</i> grupo C y G.	47
Figura 7. Halos de inhibición formados por el extracto purificado en <i>E. coli</i>	48
Figura 8. Halos de inhibición formados por el extracto purificado en <i>S. marcescens</i>	49

Índice de Anexos

Anexo 1. Descripción taxonómica del sangorache	75
Anexo 2. Análisis mineral y proximal de granos de sangorache y amaranto blanco especies del género <i>Amaranthus</i>	76
Anexo 3. Cálculo de la actividad enzimática de tripsina y de la actividad inhibidora del extracto purificado	77
Anexo 4. Cálculo de la concentración enzimática del extracto purificado	77
Anexo 5. Obtención de extractos crudo, semipurificado y purificado.....	78
Anexo 6. Curvas de crecimiento de las bacterias en estudio.	80
Anexo 7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos	82
Anexo 8. Tablas de comparación del método de sensibilidad de discos	83
Anexo 9. Prueba Tukey 0,05 Bacterias-extractos.	84

Resumen

Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana de extractos proteicos provenientes de semillas de sangorache (*Amaranthus hybridus* L.), frente a bacterias patógenas *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* grupo G y C, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*.

Para la obtención de los extractos proteicos se utilizó semillas trituradas previamente desengrasadas, las cuales se sometieron a técnicas de purificación como son ultrafiltración con centrifugación e inmovilización enzimática para obtener los extractos con tres niveles de pureza.

Luego de obtener los extractos se evaluó la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión de disco en agar, prueba que permitió medir la susceptibilidad *in vitro*. Los resultados fueron reportados en función del tamaño del halo de inhibición de crecimiento formado por las bacterias frente a los extractos y se interpretó de forma cuantitativa a través de un diseño completamente al azar y cualitativa mediante la comparación de los resultados con tablas del manual del CLSI.

Los mejores resultados se obtuvieron con los extractos semipurificado y purificado, ya que inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *S. marcescens* y *Streptococcus* grupo C y G, pero sobresale el tratamiento 7 que presentó un halo de inhibición de 14,57 mm, mucho mayor al resto de tratamientos. Basado en los manuales del CLSI, *Escherichia coli* estuvo dentro

de la categoría intermedia frente a los extractos semipurificado y purificado, y el resto de las cepas fueron catalogadas como resistentes frente a los tres tipos de extractos proteicos.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, inhibidores, extractos proteicos, sangorache.

Abstract

This study evaluated the antimicrobial activity of protein extracts from seeds of sangorache (*Amaranthus hybridus* L.), against pathogenic bacteria *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* group G and C, *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*.

To obtain the protein extracts, previously degreased crushed seeds were used, which were subjected to purification techniques such as ultrafiltration with centrifugation and enzymatic immobilization to obtain the extracts with three levels of purity.

After obtaining the extracts, the antimicrobial activity was evaluated using the disk diffusion technique in agar, a test that allowed to measure the susceptibility in vitro. The results were reported based on the size of the growth inhibition halo formed by the bacteria versus the extracts and was interpreted quantitatively through a completely randomized and qualitative design by comparing the results with tables from the CLSI manual. The best results were obtained with the semi-purified and purified extracts, since they inhibited the growth of *E. coli*, *S. marcescens* and *Streptococcus* group C and G, but treatment 7 that showed an inhibition halo of 14.57 mm, much greater than the rest of treatments. Based on the CLSI manuals, *Escherichia coli* was in the intermediate category compared to the semi-purified and purified extracts, and the rest of the strains were cataloged as resistant to the three types of protein extracts.

Keywords: antimicrobial activity, inhibitors, protein extracts, sangorache

Introducción

Las leguminosas y cereales andinos se caracterizan por contener altos niveles de proteína que pueden en gran parte ser inhibidores de proteasas, su consumo se ha asociado con una menor incidencia de cáncer oral, colón, mama, próstata y faríngeos (García C. , 2014).

Los inhibidores de proteasas (IPs) son biomoléculas de bajo peso molecular, que tienen la capacidad de regular la actividad proteolítica; por lo que en los últimos años se han empleado con fines médicos para aminorar trastornos hereditarios, en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inmunológicas, inflamatorias, cardiovasculares, entre otras (García, y otros, 2009).

En Ecuador la Escuela Politécnica Nacional ha llevado a cabo investigaciones en los últimos 10 años sobre inhibidores de proteasas provenientes de cereales, gramíneas y leguminosas andinas con sus posibles aplicaciones, como el estudio desarrollado por Muñoz (2011) que evidenció la presencia de inhibidores de tripsina provenientes de semillas de chocho (*Lupinus mutabilis*, var I-450-Andino), fréjol (*P. vulgaris*, var I-414-Yunguilla) y arveja (*P. sativum*, var. Lojanita).

Según la investigación de Gómez (2013), en las semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) se ha determinado un alto contenido de inhibidores de proteasas, lo que concuerda con la investigación de Echeverría (2014) que dio como resultado la purificación y caracterización de inhibidores de tripsina, indicando que la mayor actividad inhibidora se encontró en semillas de sangorache.

Por otra parte, los inhibidores de proteasas también presentan actividad inhibidora del crecimiento microbiano, han surgido en los últimos 25 años y pueden denominarse

péptidos antimicrobianos (PAMs), son moléculas que presentan un potencial uso clínico, ya que poseen numerosos mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia (Téllez & Castaño, 2010).

Los mecanismos de acción de los PAMs pueden ser interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, de los agentes causales de enfermedades o con funciones inmunomoduladoras (Hale & Hancock, 2007).

La resistencia antibiótica que se ha presentado durante los últimos tiempos muestra la necesidad de cambiar las estrategias en el tratamiento de infecciones y enfermedades comunes en la población (Malavic & Lohner, 2016). El estudio de péptidos antimicrobianos (inhibidores de proteasas) de origen vegetal podría constituir una herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. Su modo de acción se orienta a potenciar una respuesta inmunológica en los pacientes o actuando directamente sobre los agentes causales (Mahlapuu, Hakansson, Ringstad, & Bjom, 2016).

Una de estas herramientas es la evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos vegetales frente a microorganismos prototipo causantes de patologías oportunistas habituales, que permita conocer su mecanismo de acción al interactuar con los agentes infecciosos (Malavic & Lohner, 2016).

Según el estudio de Echeverría (2014) las semillas de sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) están compuestas por péptidos de pequeño tamaño con actividad inhibitoria de proteasas como tripsina que podrían ser parte de un nuevo grupo de sustancias que complementen el conjunto clínico, y por sus características podría presentar una baja resistencia desarrollada por los microorganismos siendo esta una ventaja con relación a

los antibióticos convencionales. Por lo que se consideran como los mejores modelos para la industria química en el diseño de nuevos fármacos (Salas, Badillo, Ramirez, & Oliver-Salvador, 2015).

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos proteicos inhibidores de tripsina provenientes de semillas de sangorache (*Amaranthus hybridus* L.). Los objetivos específicos fueron obtener extractos proteicos: crudos, semipurificados y purificados con capacidad inhibidora de tripsina provenientes de semillas de sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) y determinar la capacidad antimicrobiana de extractos frente a cinco cepas diferentes de bacterias seleccionadas.

El desarrollo de la metodología consto de dos partes la primera con la finalidad de obtener los extractos proteicos crudo, semipurificado y purificado de las semillas se realizó en los laboratorios del Departamento de Ciencias Nucleares de la Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria de la Escuela Politécnica Nacional (EPN) y la segunda parte para determinar la actividad biológica o específicamente la actividad antimicrobiana de los extractos se hizo en los Laboratorios Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS). La actividad antimicrobiana de los tres extractos fue determinada de forma cuantitativa y cualitativa.

De forma cuantitativa a través de un diseño completamente al azar (DCA) de 20 tratamientos, para el análisis estadístico se empleó análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey 0,05 % en el programa *InfoStat*; y cualitativa mediante tres categorías: susceptible, resistente e intermedia al comparar los datos de la experimentación, con tablas

del manual del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) acerca de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana con discos.

La variable evaluada para ambas respuestas fue el tamaño del halo de inhibición formado por las bacterias frente a los extractos proteicos crudo, semipurificado y purificado de semillas de sangorache.

Las hipótesis planteadas para este estudio fueron: los tres extractos proteicos obtenidos a partir de semillas de sangorache con capacidad inhibidora para tripsina no presentan actividad antimicrobiana, frente a ninguna de las cepas en estudio y al menos uno de los extractos proteicos obtenidos a partir de semillas de sangorache con capacidad inhibidora para tripsina presenta actividad antimicrobiana, frente alguna de las cepas en estudio.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1 Proteínas

La palabra proteína se deriva del griego *proteios* cuyo significado es primario (Vasudam, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011). Estas macromoléculas se encuentran conformadas por pequeñas unidades estructurales, denominados aminoácidos que se unen por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino (Martínez & Martínez, 2006).

Los principales componentes de las proteínas son el carbono, nitrógeno, oxígeno y en menor cantidad fósforo y azufre; el 16 % en peso de una proteína normal lo representa el nitrógeno (Vasudam, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011). La estructura proteica puede ser: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, la estructura primaria posee un conjunto de aminoácidos en forma lineal unidos mediante enlaces peptídicos, una estructura secundaria presenta complejos agregados llamados motivos; a la unión de varios motivos se conoce como dominios. Los dominios tienen poder catalítico independiente a la proteína. La estructura terciaria es considerada como la responsable de la actividad biológica. El último nivel de organización, cuaternario, es el resultado de la unión no covalente entre péptidos y dan la conformación globular de las proteínas (Arboleda, 2011).

Díaz y Juárez (2007) mencionan un quinto nivel estructural de las proteínas, también denominado nivel biológico, que es aún desconocido. Sin embargo, está presente en proteínas de la cadena respiratoria o del transporte de electrones localizadas en la membrana interna de la pared celular de la mitocondria.

1.1.1 Importancia de las proteínas

Las proteínas son moléculas producidas en el metabolismo primario de los organismos, se considera que las tres cuartas partes de un sistema biológico están constituidas por proteínas. Estas moléculas tienen a su cargo aspectos funcionales y estructurales celulares una alteración en su composición puede generar cambios en el metabolismo e incluso enfermedades (Vasudam, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011).

A este grupo de moléculas pertenecen las enzimas que son catalizadores biológicos también algunos elementos transportadores de sustancias como la hemoglobina y las lipoproteínas; hormonas por ejemplo la insulina e inumonoglobulinas (moléculas encargadas del reconocimiento celular), estas funciones son posibles por la variedad de estructuras de las proteínas, que están sujetas a la regulación de la expresión de genes dada por el ADN y el ARN mensajero para llevar a cabo una función específica (Díaz & Juárez, 2007).

1.2 Enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas, con una composición específica de aminoácidos que determina su función, están presentes en las reacciones químicas de los seres vivos. Fueron reconocidas como catalizadores a finales del siglo XVIII, su poder catalítico es superior frente a catalizadores sintéticos e inorgánicos (Lehninger, 2005).

La principal característica de las enzimas es su especificidad por un sustrato al que se acopla a través de un sitio activo, esta unión la conforman residuos de aminoácidos, al construir el complejo “de la llave y la cerradura” de esta manera la velocidad de una

reacción química o biológica aumenta y al finalizar el producto queda libre de la enzima (Voet & Voet, 1992).

1.2.1 Importancia de las enzimas

Las enzimas durante la catálisis no se modifican ni consumen, presentan alta especificidad por el sustrato. A nivel celular esta característica permite que los controles de diversos procesos químicos se desarrollen de forma independiente. La velocidad de una reacción catalizada por una enzima en la cual transformará varios sustratos en productos por lo general es mejorada con un factor de 10^6 veces (Kennelly & Rodwell, 2007).

Las transformaciones de diferentes productos *in vitro* catalizadas por enzimas aisladas de microorganismos pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, química y alimenticia (Casablancas, y otros, 2005).

1.3 Factores que afectan la actividad enzimática

1.3.1 pH

Las enzimas tienen un pH óptimo, en un rango habitual entre 6 y 8 para su trabajo, que está relacionado con la carga de los residuos del sitio activo. El pH puede cambiar por la temperatura, la concentración de sustrato y afecta a la catálisis, cuya grafica de representación es en forma de campana (Vasudam, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011).

1.3.2 Temperatura

Es conocida como temperatura óptima, “en la cual una máxima cantidad de sustrato es convertido en producto por unidad de tiempo” (Vasudam, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011). En una reacción enzimática la temperatura optima está en un rango entre 10 °C y

40 °C (De Lera, 2011), al alcanzar temperaturas entre 60 °C y 70 °C la enzima empieza a desnaturalizarse haciendo que la reacción sea más lenta (Campobell & Farrell, 2016).

1.3.3 Concentración de sustrato

El aumento de sustrato a una reacción enzimática no afecta la velocidad máxima de la reacción. En un principio puede aumentar la velocidad de esta, pero después la misma se mantiene. A bajas concentraciones de sustrato algunas enzimas no están activas; al agregar una cantidad excesiva de sustrato la actividad catalítica puede notarse disminuida puesto que el sitio activo de las enzimas ya está saturado (Vasudam, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011).

1.4 Clasificación de las enzimas

Varias han sido las características para establecer la clasificación de las enzimas pues los nombres más comunes de las enzimas se relacionan con el tipo de reacción que catalizan o su origen, sin embargo con el objetivo de crear una nomenclatura única para las enzimas la *International Union of Biochemis* (IUB) estableció un sistema en el que cada enzima tiene un código numérico y un nombre único (Kennelly & Rodwell, 2007).

Las enzimas se han organizado en seis clases de acuerdo con la reacción que catalizan como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Clasificación de las enzimas de acuerdo con la reacción catalizada

N clase	Nombre de clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones (oxidación y reducción)
2	Transferasas	Transferencia de grupos (glucosilo, metilo o fosforilo)
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrolisis de enlaces C-C, C-O.
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces.
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de las moléculas.
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N por reacciones de condensación acopladas a la ruptura de ATP o un cofactor similar.

Fuente: (Lehninger, 2005)

1.4.1 Proteasas

Dentro de la tercera clase de enzimas, hidrolasas, están las proteasas o proteolíticas que utilizan como sustrato proteínas o péptidos de mayor tamaño cortando su estructura hasta péptidos más simples o hasta su unidad básica, los aminoácidos. Las proteasas transforman una estructura compleja en una estructura sencilla mediante la adición de una molécula de agua aumentando su velocidad (Garcia, 2013).

Las proteasas han sido reconocidas en plantas, controlan procesos como la germinación de semillas, mecanismos de defensa, el crecimiento y desarrollo. La cantidad de proteasas en una planta puede variar de acuerdo con condiciones medioambientales como el cambio en los nutrientes del suelo, intensidad de la luz o la limitación en la disponibilidad del agua. De forma general en todos los organismos potencian respuestas en cascada y la

degradación de proteínas erróneas (Rusting, Boex, Reinbothe, Wettstein, & Reinbothe, 2018).

1.4.1.1 Clasificación de las proteasas

Está basada en aspectos como: el mecanismo catalítico, las regiones del polipéptido sobre las que trabajan, además de las relaciones evolutivas y la similitud de sus secuencias aspectos considerados por la gran cantidad de proteasas conocidas en los siete reinos biológicos (Errasti, 2013). Según el mecanismo catalítico hay cuatro clases de proteasas: serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas. Agrupadas en base al grupo químico del sitio activo formado respectivamente por serina, cisteína, ácido aspártico e ión metálico (Errasti, 2013). Algunas de las características más importantes de estos grupos se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2

Principales características de las cuatro clases de proteasas

Proteasa	Características	Ejemplo
Serínicas	Su sitio activo tiene un residuo de serina y el sustrato generalmente trabajan en condiciones de pH alcalino, no necesitan de un activador (Cisneros, 2017).	Tripsina, Quimotripsina, Factores de coagulación.
Cisteínicas	En su sitio activo el nucleófilo es un residuo de cisteína (Escudero, 2017).	Papaína
Aspárticas	Poseen dos cadenas laterales de aspartato en diferentes subunidades participantes en el mecanismo de acción (Cisneros, 2017).	Renina, Proteasas retrovirales
Metaloproteínas	Están ligadas a un metal cuya actividad proteasa es dependiente del zinc, y requieren calcio para llevar a cabo su acción biológica y mantener su estabilidad (Escudero, 2017).	Carboxipeptidasas

Elaborado: (Las autoras, 2018)

1.5 Tripsina

Se origina a partir del tripsinógeno, sintetizado por una porción del páncreas. De la activación del tripsinógeno se obtienen tres cadenas que están unidas por un enlace de sulfuro y forman dos dominios tipo barril- β que protegen al sitio activo (Cisneros, 2017). Presenta una triada catalítica en el sitio activo formada por residuos de aspartato, histidina y serina. Tiene un peso molecular entre 22 a 28 KDa. Su función es cortar los enlaces peptídicos los extremos carboxilo de aminoácidos básicos arginina y lisina teniendo una predilección diez veces superior por la arginina. Los primeros estudios referentes a esta enzima se han desarrollado en especies marinas (Candiotto, y otros, 2018).

1.6 Inhibidores de proteasas (IPs)

Eliminan la función de las proteasas al unirse con la misma en el sitio activo anulando su función biológica a través de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y disulfuro, son de bajo peso molecular pueden tener entre 15 y 40 aminoácidos en su estructura.

La mayor parte de los IPs tienen características hidrofóbicas, son catiónicos y presentan un alto contenido de residuos de cisteína que constituyen puentes disulfuro por lo cual resisten a altas temperaturas o cambios bruscos de pH. Se encuentran en plantas, animales y microorganismos. Se clasifican en relación con las proteasas que inhiban como: serínicas, cisteínicas aspárticas, metalo, glutámico y treonín peptidasa (Rawlings, 2010).

Su acción es selectiva frente a enzimas de origen vegetal o animal. De acuerdo con Alburquerque, Zapata, Bermúdez & Leiva (2018) los inhibidores de proteasas tienen efecto sobre enzimas de insectos con una posible aplicación como controlador biológico.

Otro ejemplo de selectividad de las proteasas es al inhabilitar a la enzima tripsina mediante la alteración de la configuración de su sitio activo o al modificar su estructura nativa disminuyendo la actividad catalítica (Cisneros, 2017).

1.6.1 Mecanismos de acción de los IPs

Existen dos mecanismos de acción de los IPS son reversible e irreversible para la inhibición de la actividad enzimática. Su descripción se muestra en la tabla.3.

Tabla 3.

Descripción de los mecanismos de inhibición enzimática

Mecanismo de acción	Descripción
Reversible	En los inhibidores reversibles la unión es directa entre sitio activo de la proteasa y el inhibidor, sin embargo, este complejo se puede disociar tanto en el estado inicial de la proteasa como en el estado modificado.
Irreversible	Los inhibidores irreversibles alteran la conformación de la enzima al cortar un enlace peptídico interno y al unirse de forma covalente perdiendo la capacidad de disociarse y volver a catalizar otra reacción.

Fuente: (Cisneros, 2017)

1.6.2 Fuentes de inhibidores de proteasas (IPs)

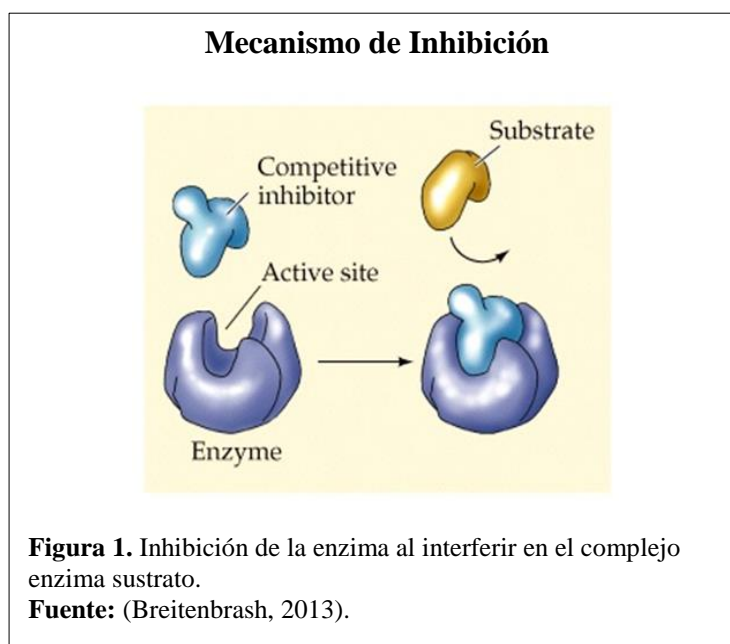
Los IPs están ampliamente distribuidos en plantas leguminosas en especial en semillas, así como también en otros órganos de las plantas como hojas, flores o tallos. La maduración de una semilla es considerada como un evento de defensa y es en el mismo en donde existe mayor cantidad (Elizalde, Porilla, & Chaparro, 2009).

La resistencia de las plantas frente a insectos y herbívoros está relacionada con la expresión de genes para IPs, expresadas por las células afectadas del tejido, así como

también células de tejidos alejados dando como producto final la confluencia de inhibidores de varios tipos. La presencia de la mayor cantidad de IPs se ha identificado en las familias *Graminacea*, *Leguminaceae* y *Solanaceae* (Cisneros, 2017).

1.6.3 Inhibidores de Tripsina

Poseen dominios denominados de Kunitz, la inhibición se da con un mecanismo canónico, cuando el inhibidor de tripsina adopta una forma idéntica al sustrato con una hebra corta de aminoácidos, que se alinea a los residuos antiparalelos de tripsina. El sitio activo de la enzima tiene una forma de lazo saliente y es estabilizado por un enlace disulfuro formando el complejo tripsina-inhibidor anulando la función de la enzima (Parizi, y otros, 2018). Como se muestra en la figura 1.



Los inhibidores de tripsina tienen la capacidad para eliminar la función de enzimas digestivas en la hidrólisis de proteínas, dando como resultado la pérdida de aminoácidos

esenciales como la cisteína y la metionina esenciales para los organismos (Rodríguez P. , 2017).

Con potenciales aplicaciones biomédicas y biotecnológicas han sido aislados algunos inhibidores de tripsina, de matrices vegetales, como las semillas de mostaza blanca (*Sinapis alba*), el comino negro (*Pseudostellaria heterophylla Rupr. & Maxim*) de cuyas raíces se obtuvo un inhibidor con un efecto antimicótico y en el girasol (*Helianthus annuus*) del cual se ha aislado un inhibir cíclico de tripsina (Caffini, 2016).

En semillas como el amaranto y el sangorache, con tratamientos térmicos los inhibidores de tripsina pueden disminuir su actividad sin embargo se mantienen bajas concentraciones residuales (Rodríguez P. , 2017).

1.6.4 Inmovilización enzimática

Es una técnica de confinamiento de una enzima en una matriz manteniendo las condiciones específicas de catálisis para alargar el periodo de uso de la enzima durante algunos procesos, al mejorar la estabilidad enzimática y facilitar su separación del producto (Cabral, Dorantes, Calva, Lucho, & Beltran, 2018).

La efectividad de la inmovilización enzimática está ligada al tipo de material utilizado como matriz, la posición en la cual queda el sitio activo de la enzima dentro de la matriz dependerá de la saturación de la solución enzimática natural o comercial y el grado de compatibilidad. La inmovilización tipo covalente de tripsina aumenta la probabilidad de unión entre la enzima y el sustrato o inhibidor debido a que queda mejor expuesto su sitio activo por acción de un brazo espaciador (Moreira, Batista, Castro, Lima, & Fernandes, 2015).

1.6.5 Cromatografía de afinidad

Es una técnica que permite separar e identificar moléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos de una mezcla basada en el uso de una fase estacionaria compuesta por una sustancia sólida y una fase móvil líquida. Uno de los tipos de cromatografía de afinidad, es la cromatografía de columna empleada para la purificación de proteínas bajo parámetros como su tamaño o la carga neta, dependiente del tiempo y el volumen de la muestra recuperada (Coskun, 2016).

Mediante la inmovilización de tripsina y la aplicación de cromatografía de afinidad se puede alcanzar niveles de refinamiento y caracterización de proteínas, como lo señala el estudio de Dabhade, Mokashe,&,Patil (2016) en el mismo que aislaron inhibidores de tripsina a partir de semillas de *Albizia amara Boiv* con actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* y *Candida albicans*.

1.7 Sangorache (*Amaranthus hybridus* L.)

El sangorache pertenece a la familia botánica de las *Amaranthaceas* al género *Amaranthus*, este género contiene más de 70 especies de las cuales la gran mayoría son nativas de América y apenas 15 provienen de Europa, Asia, África y Australia (Peralta Idrovo, 2009). Descripción Botánica de sangorache se puede observar en el *Anexo 1*.

Con base en el estudio de Adhikary & Pratt (2015) sangorache es un ancestro que ha dado origen algunas variedades de amaranto que se encuentran distribuidas en el mundo, al estudiar algunas características morfológicas con respecto a la variación del patrón floral teniendo en cuenta que el color negro de sus semillas es propio de esta especie.

La inflorescencia es una panoja, ingrediente principal de tisanas preparadas en farmacias galénicas por la presencia de polifenoles, también es un colorante natural característica que le otorga compuestos como amarantinas y betacianinas (Peralta, Villacrés, Mazón, & Rivera, 2008).

1.7.1 Importancia y aplicaciones del sangorache

Es un pseudocereal del grupo de las dicotiledóneas condición que difiere de los cereales que son monocotiledóneas por ejemplo el trigo o el maíz (Janssen, y otros, 2016). Se encuentra catalogado en el grupo de especies consideradas como patrimonio natural de la región andina junto con la quinua, amaranto y el chocho, estos productos son de importancia para la seguridad y soberanía alimentaria, se desarrolla en la región andina (Murillo, 2015).

Es utilizado en el ámbito alimenticio y de medicina ancestral, se puede consumir las hojas de la planta en ensaladas o en la preparación de bebidas tradicionales ecuatorianas, además es empleada para controlar cuadros de ansiedad, nervios y en infusión su inflorescencia alivia problemas digestivos. A partir de las semillas se puede extraer aceite, que en la cultura China es empleado en el tratamiento efectivo para migrañas y personas con hipertensión (Marin, Medina, Salinas, Villacres, & Barria, 2014).

De acuerdo con la investigación de Janssen y otros (2016) entre las moléculas que conforman las semillas de sangorache hay proteínas de reserva y funcionales entre ellas albuminas extraíbles en presencia de agua, globulinas en soluciones acuosas 0,4N de cloruro de sodio y las prolaminas en soluciones alcohol 60 % v/v de etanol. En los pseudocereales se encuentra en mayor proporción prolaminas.

Las semillas de sangorache de acuerdo con Peralta y otros (2008) presentan entre 14 y 17 % de proteína, 14 % de fibra, 6 % de grasa, 62 % de carbohidratos y minerales.

Según Alvarado (2011) al analizar dos genotipos de sangorache señala que la cantidad de proteína encontrada es de 13,7 mg de Proteína/100g de muestra. En el estudio desarrollado por Fajardo y Criollo (2010) se evidenció que el contenido de lisina un aminoácido esencial para los seres vivos es mayor en la harina de sangorache al compararla con la harina de trigo. Como se evidencia en el *Anexo 2* acerca del análisis mineral y proximal de granos de especies del género *Amaranthus*.

Adicionalmente la harina de sangorache se utiliza para la obtención de extractos con diferentes solventes, según el trabajo de Fajardo y Criollo (2010) el agua es el mejor solvente para sustancias solubles en la harina de sangorache entre las cuales se podría encontrar moléculas con actividad antimicrobiana.

1.8 Actividad antimicrobiana

Los antimicrobianos son sustancias con la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, virus o parásitos. Tienen dos mecanismos de acción el primero es generando la muerte del microorganismo invasor y el segundo interfiriendo en su desarrollo cumpliendo con el principio de toxicidad selectiva, el cual comprende la focalización de su acción sin afectar al huésped. De forma general sus mecanismos de acción tienen como objetivo la inhibición en la síntesis celular, proteica, de ácidos nucleicos o de metabolitos esenciales (Tortora, Funke, & Case, 2017).

Los términos antibióticos y antimicrobianos han sido utilizados de forma sinónima sin embargo el termino antibiótico se puede definir como un producto del metabolismo

microbiano que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos, por ejemplo la neomicina, que es resultado del metabolismo de *Streptomyces fradiae*, mientras que los antimicrobianos son sustancias cuyo origen puede ser vegetal, animal o microbiano (Peralta & Juarez, 2011).

1.8.1 Péptidos antimicrobianos

Se descubrieron hace más de 90 años, el primer péptido antimicrobiano (PAMs) fue la gramicidina en el año 1939 y se lo empleó contra las infecciones por neumococo (González, San Juan, Morales, & Otero, 2017). Son moléculas que se han conservado evolutivamente en los mecanismos de defensas de una amplia variedad de organismos como: bacterias, hongos, virus, insectos, plantas y vertebrados (Guani, Santos, Lugo, & Terán, 2010). Los PAMs son unidades aminoacídicas pequeñas entre 12 a 100 unidades usualmente catiónicos, anfipáticos, es decir que poseen un lado hidrófobo e hidrófilo que permite que la molécula sea soluble en ambientes acuosos y que igualmente ingrese en membranas ricas en lípidos (Sánchez, 2016). La clasificación de los PAMs es difícil por su considerable diversidad, pero pueden ser divididos con relación a la composición de aminoácidos, tamaño y estructura conformacional (Guani, Santos, Lugo, & Terán, 2010).

En el grupo de péptidos antimicrobianos de origen vegetal se encuentran los inhibidores de proteasas como tripsina, que son conocidos como antinutricionales, sin embargo, su mecanismo de acción ha permitido el desarrollo de medicamentos modelo para enfermedades como la pancreatitis o la hipertensión (Rodríguez P. , 2017).

Por la resistencia a los antibióticos tradicionales de los últimos tiempos, los péptidos antimicrobianos de matrices vegetales o animales se han añadido al desarrollo

farmacéutico, por sus diferentes tipos de mecanismos de acción con relación a los agentes patológicos (Yang, Zhang, Zhang, Li, & Huang, 2018).

La importancia del complejo formado entre la enzima y el inhibidor radica en la posibilidad de trabajar con inhibidores enzimáticos naturales como una alternativa frente a la evolución de las enfermedades infecciosas, pues estas biomoléculas presentan actividad antimicrobiana (Dabhade, Mokashe, & Patil, 2016).

1.9 Bacterias en estudio patógenos oportunistas

1.9.1 *Escherichia coli*

Es una bacteria gramnegativa, con forma de bacilo, anaerobio facultativo, miembro de la familia *Enterobacteriaceae* (Leboffe & Pierce, 2010). Varias son las estrategias utilizadas por esta bacteria para adaptarse y sobrevivir durante la etapa de infección, los estudios se han direccionado a conocer la formación de biopelículas, así como su capacidad para comunicarse mediante pili o toxinas para generar resistencia (Reza, Habibi, & Bouzari, 2019).

Es un patógeno oportunista que habita el tracto intestinal de los seres humanos, puede ocasionar diarrea, infecciones del tracto urinario, sepsis, bacteriemias, infecciones intestinales y meningitis (Vignoli, 2017).

En el caso de infecciones del tracto urinario al presentarse resistencia antibiótica, el antibiótico puede atacar a reservorios de bacterias en algunos tejidos, pero también permitir albergar bacterias en la vejiga (Terlizzi, Gribaudo, & Maffei, 2017).

La resistencia antibiótica en este tipo de patologías promueve la búsqueda de otro tratamiento, como los péptidos antimicrobianos. Se la puede adquirir comúnmente por

intoxicación con alimentos, por lo cual es una razón de preocupación en los sistemas de salud (Camacho, 2012).

1.9.2 *Micrococcus luteus*

Es una bacteria grampositiva, esférica, organizada en tétradas o en racimos con un tamaño, son aerobios estrictos. La producción de pigmentos carotenoides, confiere a esta bacteria un típico color amarillo, con una textura cremosa y lisa (Benavides & Hermida, 2008). Es un patógeno oportunista sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, frecuentemente genera infecciones odontológicas, endocarditis, artritis séptica, e infecciones pulmonares (Rubio, 2013; Camacho, 2012).

El desarrollo normal de las células bacterianas puede ser alterado por interacciones con enzimas provenientes de agentes extraños como extractos de matrices vegetales. Las bacterias emiten una respuesta de defensa modificando su morfología, en algunos casos el color de las colonias, que es un indicador del desarrollo normal de biofilms comunes como respuesta al estrés del medio (Benavides & Hermida, 2008).

1.9.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Es un microorganismo que habita permanentemente el suelo, agua dulce, y en material vegetal, aeróbica, móvil, gramnegativa que produce un pigmento verde difusible cuando crece en medios sólidos, llamado piocianina (Leboffe & Pierce, 2010).

Es una de las bacterias con mayor resistencia natural por sus características fisiológicas, como su capacidad para variar el blanco de ataque de los antibióticos, sintetizar enzimas de defensa, cambiar su ruta metabólica y al poseer bombas de expulsión (Correa, Bravo, Silva, & Montiel, 2015).

Puede causar neumonías, sepsis de herida, bacteriemia, infecciones al tracto urinario, infecciones de las quemaduras y la mayoría de los casos del “oído de nadadores” que provoca una infección en canal auditivo externo (Stainer, Ingraham, Wheelis, & Painter, 2010).

La inhibición de la síntesis de enzimas de defensa, que hidrolizan grupos funcionales de antibióticos, mediante la presencia de péptidos antimicrobianos de semillas como las de sangorache es una propuesta para el tratamiento de cepas de *Pseudomonas* resistentes (Murillo, 2015).

1.9.4 *Serratia marcescens*

Bacteria gramnegativa con forma de bacilo anaerobio facultativo, móvil mediante flagelo peritricos, enzima oxidasa negativa y produce un pigmento rojo característico denominado prodigiosina. Se encuentra en el suelo, agua, aire, plantas y animales. Poseen una alta capacidad para invadir y sobrevivir en el tracto intestinal de los humanos por lo que implica un riesgo para la salud como patógenos oportunistas (Hopkins, y otros, 2017).

Puede causar neumonía, infecciones intravenosas asociadas a cateterismos, infecciones del tracto urinario, septicemia, meningitis osteomielitis, endocarditis e infecciones de heridas. Las infecciones causadas por *S. marcescens* son difíciles de tratar debido a la resistencia a antibióticos como los β -lactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas (Di Venanzio, 2014). El estudio de inhibidores de proteasas como tripsina podría ser un modelo para complementar las terapias médicas actuales.

1.9.5 *Streptococcus* grupo C y G

El género *Streptococcus* es un grupo muy variado, cuyas bacterias tienen la forma esférica, grampositivas, catalasa negativa, anaerobia facultativa, fermentan glucosa produciendo ácido láctico y con inclinación a formar cadenas (Montes & García, 2007).

Streptococcus del grupo C y G comparten rasgos con los grupos A y B como la producción de exotoxinas llamadas estreptolisinas, que actúan en casos de defensa para asegurar la perpetuación de la especie, siendo agentes causales de faringitis en niños y adultos (Fernández & del Pozo, 2018).

Además, en los últimos años han adquirido importancia clínica por ser los causantes de faringoamigdalitis bacteriana cuando años atrás solo se le atribuía a *Streptococcus pyogenes* (Lopardo, 2013).

Las respuestas de defensa de las colonias de microorganismos como el grupo antes mencionado pueden ser extracelulares o intracelulares dependiendo del nivel de estrés al que son sometidos. En algunos casos frente a la exposición de antimicrobianos en su medio natural o sintético para perturbar su desarrollo. Con el fin de controlar o erradicar a su población mediante un agente para el cual no han generado una respuesta de defensa o alerta (Fernández & del Pozo, 2018).

1.10 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Son métodos estandarizados que se emplea para medir la efectividad de los antibióticos y de otros agentes antimicrobianos frente a microorganismos patógenos (Leboffe & Pierce, 2010). Basados en manuales estipulados por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), el mismo que promueve las buenas prácticas de laboratorio y la

mejora en la calidad los servicios médicos a nivel mundial, conformado por entidades gubernamentales junto con especialistas en ámbitos médicos e industriales. Tiene a su cargo también la homologación de métodos para la evaluación del suministro de medicamentos en tratamientos de enfermedades infecciosas (CLSI, 2018).

Se puede utilizar algunas técnicas para medir la sensibilidad *in vitro* de las bacterias frente a antimicrobianos, señalados en el manual del CLSI, entre ellos las técnicas de dilución en agar y el método de difusión de discos, el cual ha sido estandarizado, certificado como exacto, reproducible y económicamente aceptable (Zurita, 2012).

1.11 Difusión de discos (Método M02)

La prueba de Kirby-Bauer también llamado la prueba de difusión de discos, mide la efectividad de los agentes antimicrobianos frente a microorganismos patógenos. En esta prueba los discos de papel son impregnados con el antimicrobiano de estudio y colocados sobre una caja Petri previamente inoculada con la bacteria seleccionada, a través de un hisopado. Las cajas son incubadas por un tiempo de 18 a 24 h para que la bacteria crezca y también el agente antimicrobiano se difunda en el agar, si la bacteria es susceptible aparecerá una zona limpia alrededor del disco, donde el crecimiento ha sido inhibido (Leboffe & Pierce, 2010).

Adicionalmente se utilizan testigos que permita observar la respuesta de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas, como gentamicina un aminoglucósido que presenta una acción bactericida rápida, la actividad de gentamicina se orienta principalmente contra bacterias gramnegativas y en combinación con betalactámicos se puede lograr actividad antibacteriana contra cocos grampositivos (Rodríguez M. , 2002).

Capítulo 2

Metodología

2.1 Obtención de los extractos proteicos

2.1.1 Extracción de grasa de la harina de semillas de sangorache

Se molieron 1 kg de semillas de sangorache variedad INIAP – Rubí con un 5 % de pérdidas hasta obtener harina fina, con un tamaño de partícula menor a 1 mm. Se removió la grasa de la harina mediante extracción sólido-líquido, con 1 L de 1-propanol como solvente en un equipo soxhlet por 4 horas. La harina desengrasada fue secada en la estufa marca *MEMMERT* modelo *EDELSTAHL ROSTFREI* a temperatura constante de 30 °C por 24 h. Luego se conservó la muestra a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio herméticamente sellado.

2.1.2 Preparación del extracto crudo de semillas de sangorache

Se suspendió 25 g de harina desengrasada de semillas de sangorache en tampón fosfato de sodio, marca *Panreac*, a concentración 50 mM con un pH de 7,5 en una relación harina: tampón 1:5, durante 1 h con 30 min con agitación constante de 400 rpm, luego fue centrifugada a 5000 rpm durante 40 min, el precipitado se eliminó y el sobrenadante se designó como extracto crudo y fue colocado en viales de plástico para ser conservado a -20 °C y posteriormente liofilizado.

2.1.3 Preparación de extracto semipurificado de semillas de sangorache

Un lote de extracto crudo se colocó en tubos para centrifuga Milipore, que están provistos de una membrana con un tamaño de poro de 50 kDa. La ultrafiltración centrífuga se realizó durante 45 min a 5000 rpm, se desechó el retenido y el permeado fue nuevamente cargado en una membrana Milipore con un tamaño de poro de 10 kDa, que se centrifugó durante

30 min a 5000 rpm. El permeado menor 10 kDa se le denominó extracto semipurificado, el cual se colocó en viales de plástico para ser conservado a -20 °C y posteriormente liofilizado.

2.1.4 Preparación de extracto purificado de semillas de sangorache

Para obtener el extracto purificado primero se preparó la matriz de inmovilización tripsina-glioxil-sepharosa con el propósito de ser utilizada en la obtención del extracto purificado, para el efecto se siguió el proceso que se describe a continuación.

2.1.4.1 Obtención de la matriz glioxil-sepharosa

Se mezclaron 75 g de sepharosa marca *SIGMA* con 25,7 mL de glicidol marca *SIGMA*, 35,5 mL de hidróxido de sodio marca *J.T.Baker* 1,7 M y 1,1 g de boro hidruro de sodio marca *J.T.Baker*. Se colocó en un baño de hielo y se mantuvo en agitación constante de 400 rpm a temperatura ambiente por 16 h.

A continuación, se filtró en un embudo provisto con frita y se procedió a oxidar la matriz de gliceril-sepharosa, basado en el protocolo de Quinchuela (2013) adicionando 300 mL de agua y 225 mL de peryodato de sodio marca *Fisher Scientific* 0,12 M, se agitó por 1 h, luego la matriz glioxil-sepharosa se filtró y lavó con agua destilada.

2.1.4.2 Preparación de la matriz tripsina -glioxil-sepharosa

Se prepararon 334 mL de solución enzimática de tripsina a una concentración de 7,5 mg/mL, reconstituida en tampón borato 0,1 M a pH 10. Esta solución se colocó en contacto con la matriz obtenida de glioxil-sepharosa, a temperatura ambiente, durante 24 h con agitación magnética constante de 400 rpm según el protocolo descrito por Echeverría (2014).

A continuación, para reducir la matriz tripsina-glioxil-sepharosa se adicionó 500 mg de boro hidruro de sodio en un baño de hielo por 30 min según el protocolo adaptado por Quinchuela (2013). Finalmente se filtró la matriz de tripsina inmovilizada en un filtro provisto con frita y se lavó con 10 mL de soluciones de tampón acetato 0,1 M, pH 4; tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8 y tampón borato 0,1 M pH 10 de forma alternada.

La matriz de tripsina-glioxil-sepharosa se conservó en una solución de tampón borato pH 10 en un recipiente de vidrio ámbar a una temperatura de 4 °C.

Luego de obtener la matriz de tripsina-glioxil-sepharosa se procedió a armar la columna para purificar el extracto.

2.1.4.3 Purificación de inhibidores de tripsina mediante cromatografía de afinidad

Se armó una columna de cromatografía formada por un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro con un pistón inferior, se hizo un lavado previo a la matriz de afinidad de tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL con tampón fosfato 50 Mm pH 7,5 a continuación se empacó la matriz hasta alcanzar una altura de 33 cm, necesaria para introducir el segundo pistón.

Empacada la matriz en la columna, se hizo un segundo lavado a la matriz con la misma solución tampón alimentada por una bomba peristáltica durante 30 min. Se alimentaron a la columna 5 mL del extracto semipurificado de Sangorache, seguido de un flujo de 5 mL/min de solución tampón hasta que en la corriente de salida de la columna la concentración proteica alcanzó un valor cercano a cero. Se recogieron fracciones de 3 mL de forma continua con un tiempo de recolección de 3 min.

Luego los inhibidores de tripsina fijados a la matriz de afinidad se arrastraron con un volumen de 5 mL de KCl-HCl 1 M a pH 1,66 inyectados al sistema durante el proceso.

Las fracciones con actividad inhibidora fueron recolectadas por un equipo de cromatografía marca *Pharmacia LKB* y se depositaron en viales plásticos para la liofilización del extracto purificado.

2.1.5 Liofilización de los extractos crudo, semipurificado y purificado de semillas de sangorache.

Las condiciones de liofilización para todos los extractos fueron las mismas con un secado primario de 12 h a 52 °C y una presión de vacío de 10 Pa, seguido del secado final por 32 h con una temperatura de 67 °C y la misma presión de vacío. Luego de la liofilización se procedió a determinar la concentración proteica de los extractos y la actividad inhibitoria.

2.1.6 Reconstitución de extractos de semillas de sangorache

Para la reconstitución de los extractos liofilizados a una concentración de 5 mg/mL, se pesó 25 mg de cada uno de los extractos a los cuales se adicionó 3 mL de agua destilada estéril, la solución formada se agitó durante 2 min para homogeneizarla y aforar a un volumen final de 5 mL. Procedimiento necesario para las pruebas de actividad inhibidora sobre tripsina.

2.2 Caracterización de los extractos con actividad inhibidora sobre tripsina

2.2.1 Evaluación de la actividad proteolítica de Tripsina

La actividad proteolítica de tripsina se determinó de acuerdo con el protocolo modificado de Echeverría (2014), en relación con el volumen de las soluciones empleadas de la siguiente manera: se colocó en una celda de cuarzo 3,0 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM, 0,1 mL de BapNA (N- α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida) 10 mg/mL y 0,1 mL de solución de tripsina 5 mg/mL. Se agitó el contenido de la celda y se tomó las lecturas de

absorbancia en el espectrofotómetro UV-Visible *HITACHI-1900 LIA/REG/26-B* a una longitud de onda de 400 nm cada 15 s durante 3 min, con tres repeticiones.

La actividad proteolítica se calculó en mili unidades enzimáticas por mililitro de solución enzimática (mU/mL) mediante la ecuación 1. En el *Anexo 3* se muestra un ejemplo del cálculo de la actividad enzimática.

$$AE = \frac{\Delta DO_{400}}{\Delta t} \times \frac{1000 \times V_t}{\epsilon \times L \times V_e}$$

Ecuación 1. Cálculo de la actividad enzimática.

Fuente: (Quinchuela, 2013)

Donde:

AE: Actividad proteolítica de tripsina (mU/mL)

ΔDO_{400} : Diferencia de absorbancia

ϵ : Coeficiente de extinción de p-nitroanilina a 400 nm ($8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

L: Longitud del paso de luz en la celda (1cm)

V_e : Volumen de solución enzimática (0,1 mL)

V_t : Volumen total en la celda (3,2 mL)

2.2.2 Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos

Para la evaluación de la actividad inhibidora de los extractos en la celda de cuarzo se colocó 2,6 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5; 0,4 mL de extracto, 0,1 mL de BapNA y 0,1 mL de solución de tripsina. Se agitó el contenido de la celda y se tomó las

lecturas de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm cada 15 s durante 3 min, con tres repeticiones.

La diferencia entre la actividad proteolítica de tripsina en presencia y ausencia de un inhibidor es la actividad inhibidora (AI) de cada extracto, y se expresó en unidades enzimáticas por mililitro de extracto inhibidor (U/mL). Un ejemplo del cálculo se muestra en el *Anexo 3*.

2.2.3 Determinación de la concentración proteica de los extractos

La concentración proteica de los extractos crudos, semipurificado y purificado se determinó por la técnica de espectrofotometría UV-Visible, para lo cual se colocó en una celda de cuarzo 3 mL de extracto y se registró el valor de absorbancia a 280 nm. Cuando la lectura registró un valor mayor a 1, se llevó a cabo una dilución del extracto con solución tampón y el factor de corrección fue considerado en el cálculo correspondiente con la ecuación que se muestra a continuación.

$$[P] = \frac{DO_{280} \times \frac{f}{L}}{\epsilon}$$

Ecuación 2. Cálculo de la concentración proteica.

Fuente: (Quinchuela, 2013)

Donde:

[P]: Concentración de proteína (mg/mL).

ϵ : Coeficiente de extinción a 280 nm, 1,0 (mg/mL)⁻¹ cm⁻¹

DO₂₈₀: Absorbancia a 280 nm

f: Factor de dilución.

L: Longitud del paso de luz en la celda (1cm).

2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos provenientes de las semillas de tripsina

2.3.1 Cepas en estudio

Se trabajó con cepas de bacterias patógenas oportunistas donadas por el grupo de Investigación BIOARN. Los criterios de selección de las cepas se basaron en una revisión bibliográfica acerca de su patogenicidad y las condiciones de mantenimiento de las cepas según los requerimientos de bioseguridad.

Las cepas de trabajo fueron: *Serratia marcescens*, *Streptococcus* grupo C y G, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

El código de certificación de las cepas utilizadas para este ensayo se muestra en la tabla 4, las mismas que fueron reactivadas del *Cryobank* en medio de cultivo TSA (*Trypticase Soy Agar*) marca *HIMEDIA* e incubadas durante 24 h a temperatura de 35 °C y posteriormente se las llevó a refrigeración a 4 °C.

Para la viabilidad de las cepas se realizaron resiembras periódicas en medio TSA e incubación por 24 horas, para luego conservarlas a 4 °C durante el desarrollo de la fase experimental. Además de una siembra en tubo pico flauta con medio TSA para una conservación prolongada de las cepas puras.

Tabla 4

Código de certificación de las bacterias empleadas en el estudio

Código	Cepa
ATCC14756	<i>Serratia marcescens</i>
ATCC9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAP480045	<i>Micrococcus luteus</i>
PAP49G3A	<i>Streptococcus</i> grupo C y G
ATCC25992	<i>Escherichia coli</i>

Elaborado por: Las autoras, 2018

2.3.2 Tinción Gram

Se realizaron tinciones para observar la morfología microscópica de las cepas con el fin de detectar algún tipo de contaminación y corroborar que se trabajó con cepas puras. Para lo cual se colocó en el porta objeto una gota de agua, luego con un asa bacteriológica se tomó una colonia de la cepa y se mezcló con la gota de agua para la fijación al portaobjeto, se utilizó un mechero, a continuación se añadió 1 gota de cristal violeta durante 35 s, se enjuagó, seguida de 1 gota de lugol por 1 min, se enjuagó, se añadió 1 gota de alcohol cetona para fijar el colorante y 1 gota de safranina. Se fijó y se observó en el microscopio.

2.3.3 Viabilidad de las cepas de microorganismos mediante Turbidimetría

Después de la reactivación de los microorganismos fue importante evaluar la viabilidad de estos teniendo en cuenta al tiempo de crecimiento como un factor esencial para la adaptación de metodologías descritas por el CLSI.

Las bacterias patógenas de estudio fueron inoculadas en diferentes Erlenmeyer que contenían caldo TSB (*Tryptic Soy Borth*) marca *DIFCO* y que fueron colocadas en una incubadora con agitación orbital a 35 °C y 300 rpm.

Pasado 30 min se procedió a tomar la primera lectura en función de la turbidez de cada inóculo, se tomó con una micropipeta una alícuota de 2,5 mL del Erlenmeyer que fue colocada en una celda plástica y llevada al espectrofotómetro para leer su concentración a una longitud de onda de 625 nm por triplicado en todos los casos. A partir de la primera lectura se tomó mediciones de turbidez de los inóculos cada hora durante 24 h (Cappuccino & Welsh, 2017).

2.3.4 Preparación de la escala Mac Farland 0,5

Se preparó una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,18 M y cloruro de bario (BaCl_2) 0,048 M. A continuación, se mezcló 0,5 mL cloruro de bario y 9,5 mL de ácido sulfúrico equivalente a aproximadamente 1×10^8 a 2×10^8 UFC/mL, esta solución se mantuvo en refrigeración durante la experimentación.

2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos

2.4.1 Técnica de difusión de disco en agar

Se utilizó la técnica de difusión de disco en agar de Kirby-Bauer, que es una herramienta válida para medir la efectividad de los antimicrobianos contra microorganismos patógenos (Leboffe & Pierce, 2010).

Se seleccionó 3 a 5 colonias incubadas por 18 horas y se colocó en 10 mL de suero fisiológico, se ajustó inmediatamente a la escala Mc. Farland 0,5. Posteriormente se añadió 20 mL de medio de agar Mueller Hinton Agar marca *TM media* en placas Petri

estériles y se procedió a inocular la superficie de la placa estriando con un hisopo en tres direcciones opuestas para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

Los discos de papel filtro estériles se embebieron de extracto proteico (crudo, semipurificado y purificado) con 40 mg/mL, se dejaron secar en una caja Petri, luego se distribuyeron en cada una de las cajas inoculadas previamente con las respectivas bacterias. El control positivo fue gentamicina 120 µg.

Se dejó en incubación a 35 °C durante 24 h, luego de este periodo, se realizó la medición en mm de los halos de inhibición con un pie de rey. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los extractos.



La actividad antimicrobiana fue determinada de forma cuantitativa y cualitativa en todos los ensayos.

La variable evaluada para ambas respuestas fue el tamaño del halo de inhibición formado por las bacterias frente a los extractos proteicos crudo, semipurificado y purificado de semillas de sangorache.

2.5 Diseño Experimental

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos, de forma cuantitativa, a través del porcentaje de inhibición del extracto y un diseño completamente al azar (DCA) de 20 tratamientos con tres repeticiones, que se describen en la tabla 5. Para el análisis estadístico se emplearon análisis de varianza y pruebas de Tukey 0,05 % en el programa *InfoStat*.

Las categorías para el reporte de resultados de forma cualitativa en función de las cepas frente al extracto fueron tres: susceptible, resistente e intermedia. Basado en la comparación de los datos determinados a partir de la variable evaluada, con las tablas del manual del CLSI acerca de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana con discos; las mismas que se muestran en el *Anexo 8*.

Susceptible: en esta categoría el tamaño de la zona del halo de inhibición de crecimiento fue mayor o igual a 15 mm. Indicó que el crecimiento del microorganismo fue inhibido por el extracto.

Intermedia: el tamaño de la zona del halo de inhibición de crecimiento oscilo entre los 12-13 mm. El crecimiento de las bacterias frente a los extractos fue parcialmente inhibido, algunas de sus características morfológicas pudieron haber sido modificadas.

Resistente: el tamaño de la zona del halo de inhibición de crecimiento fue menor o igual a 12 mm. La bacteria no manifiesto inhibición en su desarrollo durante el ensayo con los extractos proteicos (CLSI, 2018).

Tabla 5.

Tratamientos del ensayo de evaluación de la actividad antimicrobiana

Número de tratamiento	Tipo de Tratamiento
T1	<i>Serratia marcescens</i> + Extracto crudo
T2	<i>Escherichia coli</i> + Extracto crudo
T3	<i>Streptococcus</i> grupo C y G + Extracto crudo
T4	<i>Micrococcus luteus</i> + Extracto crudo
T5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Extracto crudo
T6	<i>Serratia marcescens</i> + Extracto semipurificado
T7	<i>Escherichia coli</i> + Extracto semipurificado
T8	<i>Streptococcus</i> grupo C y G + Extracto semipurificado
T9	<i>Micrococcus luteus</i> + Extracto semipurificado
T10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Extracto semipurificado
T11	<i>Serratia marcescens</i> + Extracto purificado
T12	<i>Escherichia coli</i> + Extracto purificado
T13	<i>Streptococcus</i> grupo C y G + Extracto purificado
T14	<i>Micrococcus luteus</i> + Extracto purificado
T15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Extracto purificado
T16	<i>Serratia marcescens</i> + Gentamicina
T17	<i>Escherichia coli</i> + Gentamicina
T18	<i>Streptococcus</i> grupo C y G + Gentamicina
T19	<i>Micrococcus luteus</i> + Gentamicina
T20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Gentamicina

Elaborado por: Las autoras, 2018

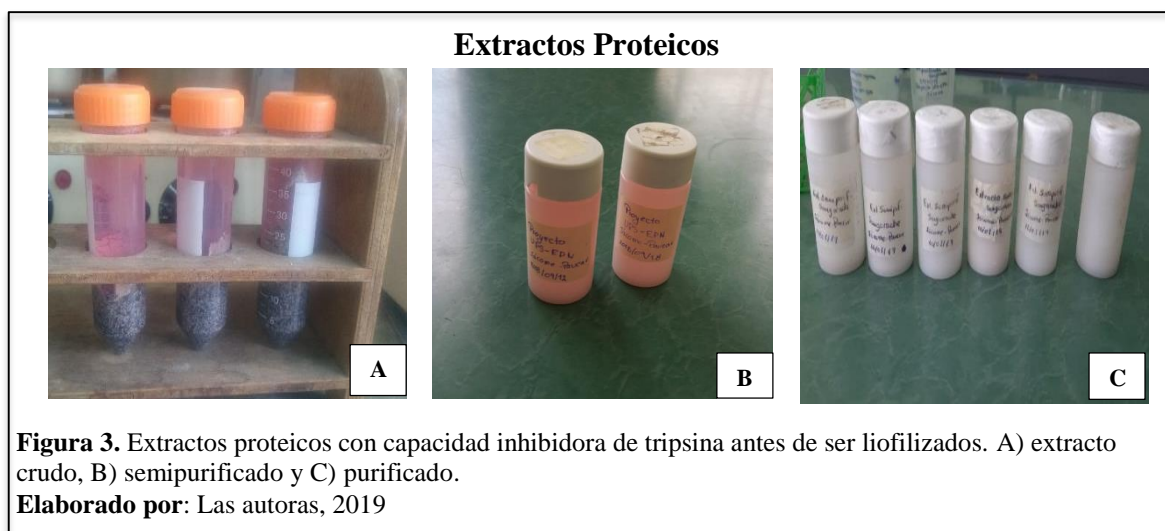
Capítulo 3

Resultados y discusión

Los resultados presentados a continuación están dispuestos en dos secciones, en la primera se refiere a la obtención de extractos proteicos provenientes de semillas de sangorache con actividad inhibidora frente a tripsina y en la segunda sección se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos, con el propósito de generar una alternativa para futuros tratamiento de enfermedades infecciosas generada por patógenos oportunistas.

3.1 Obtención de los extractos proteicos

Se obtuvo 1,3 g de extracto crudo; 0,70 g de semipurificado y 0,2 g de purificado liofilizados, a través de operaciones unitarias comunes en industrias para la estabilización de productos biológicos (Moreira, Batista, Castro, Lima, & Fernandes, 2015).



3.2 Evaluación de la actividad proteolítica de Tripsina

Se determinó que la actividad enzimática de tripsina en ausencia del inhibidor, la cual es de $386,67 \pm 20,03$ mU/mL, lo que concuerda con el estudio de Muñoz (2011) cuya actividad proteolítica estuvo comprendida entre 383,15 y 491,76 mU/mL, estos valores

son efectivos en soluciones comerciales de enzimas por su grado de inestabilidad. Las variaciones en las soluciones enzimáticas pueden ocurrir por factores como: la conservación adecuada del sustrato y enzima, la manipulación de la muestra y las condiciones ambientales (Vázquez Conde & Vázquez López, 2014).

3.3 Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos frente a Tripsina

En la tabla 6 se observa la actividad enzimática (AE) en presencia del inhibidor de cada uno de los extractos: crudo, semipurificado y purificado, determinadas a través de la ecuación 1 y la actividad inhibidora (AI) de cada extracto.

Tabla 6.

Actividad enzimática y actividad inhibitoria de los extractos proteicos de semillas de sangorache

Extracto proteico	AE con inhibidor (mU/mL sol proteica)	AI (mU/mL sol proteica)	(%) de Inhibición	Concentración Proteica (mg/mL)
Crudo	94,8±4,6	291,9±4,6	75,49	8,30
Semipurificado	59,3±1,6	327,4±1,6	84,67	2,58
Purificado	23,7±0,4	363,0±0,4	93,88	1,17

Elaborado por: (Las autoras, 2019)

En cuanto a la actividad inhibidora, el extracto crudo alcanzó un valor de 291,9±4,6 mU/mL inferior al del extracto purificado de 363,0±0,4 mU/mL resultado que coincide con Hernández, y otros (2014) quienes reportaron actividades inhibitorias similares frente a tripsina en extractos de semillas de plantas latinoamericanas como el chocho, amaranto frejol, arveja y el sangorache.

En base al porcentaje de inhibición a tripsina se determinó que el extracto crudo inhibió su actividad en un 75,49 %, mientras que el extracto purificado la inhibió en un 93,88 % manifestando una mayor cantidad de inhibidores de tripsina que podrían ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión o la pancreatitis crónica. Hegyi & Sahin-Tóth (2017) señalan importante a la inhibición de tripsina como un mecanismo de protección para el páncreas, en el tratamiento de pancreatitis crónica generada por la actividad incontrolada de esta enzima.

El extracto crudo presentó mayor concentración proteica, seguida del semipurificado y purificado como se muestra en la Tabla 6, se puede atribuir que las etapas de purificación provocaron una disminución en la concentración de proteína; varias proteínas que no podrían aportar en la actividad inhibidora, se eliminaron a través de los procesos de ultrafiltración con centrifugación y cromatografía de afinidad, lo que generó una variación en la concentración de los extractos mas no en su actividad (Castillo, Quinchuela, Echeverría, & Jácome, 2017).

Los resultados de concentración proteica concuerdan con las investigaciones de Muñoz (2011) y Echeverría (2014); además estos valores son similares con estudios de perfiles bromatológicos del género *Amaranthus* con porcentajes de proteína total con rangos de 7 a 14 % (Peralta, Villacrés, Mazón, & Rivera, 2011; Aguilar, Vega, & Cruz, 2005).

Existen otros métodos de extracción proteica, uno de ellos mediante solventes orgánicos que suelen adicionar elementos traza de los solventes a los extractos, que pueden afectar a sus actividades biológicas. En esta investigación para la obtención del extracto semipurificado se empleó ultrafiltración con centrifugación, considerado como una

tecnología limpia, que no añade ningún tipo de componente externo que pueda alterar la composición del extracto (Costa, Silveira, & Lucena, 2015).

Una característica de los extractos obtenidos fue la manifestación de un color rosado durante su preparación, después de la liofilización y luego de su reconstitución con agua destilada, debido a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides condición que también fue reportada en el trabajo de Fajardo y Criollo (2010) al preparar extractos tanto de las semillas de sangorache como de su inflorescencia.

Los factores que considerar en cuanto a la variación de la cantidad y calidad de proteína de los extractos obtenidos es la variedad de semilla empleada, asociada con sus características genéticas y las condiciones de cultivo que podrían desencadenar la expresión de caracteres de adaptabilidad. Esto difiere entre una semilla nativa y una semilla certificada o comercial (Janssen, y otros, 2016).

3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos provenientes de las semillas de sangorache con capacidad inhibidora frente a tripsina

Entre las propiedades que pueden presentar los extractos de sangorache; la actividad antimicrobiana es de gran interés por el impacto de la resistencia antibiótica que se ha presentado en las últimas décadas, siendo una amenaza cada vez mayor para la salud pública, ya que aparecen nuevos mecanismos de resistencia bacteriana que ponen en peligro la capacidad para tratar infecciones comunes. La Organización Mundial de la Salud (OMS), señala la resistencia de *E. coli* en infecciones urinarias, las cuales eran tratadas con fluoroquinolonas, pero en muchos países dicho antibiótico es ineficaz en más de la mitad de la población (OMS, 2018).

Por lo cual los péptidos antimicrobianos se han considerado como una potencial alternativa debido a sus diversos mecanismos de acción y baja resistencia frente a algunos agentes causales de enfermedades como hongos y bacterias oportunistas (Yang, Zhang, Zhang, Li, & Huang, 2018).

Se determinó la viabilidad de las bacterias a través de la técnica de turbidimetría dando como resultado que *Streptococcus* grupo G y C y *Serratia marcescens* tuvieron un rápido desarrollo en comparación con las demás cepas, evidenciado en sus respectivas curvas de crecimiento como se muestra en el *Anexo 7*, por lo cual el tiempo de incubación máximo para el ensayo de sensibilidad fue de 18 h como lo señala el protocolo M02 establecido por el CLSI.

En este experimento, la capacidad antimicrobiana fue determinada a través del diámetro del halo de inhibición, el cual depende de dos factores: bacteria y extracto proteico. A continuación, se presentan las tablas 7, 8 y 9 que describen los resultados del experimento. Adicionalmente se realizó un ANOVA en el programa informático *InfoStat* para determinar si hubo diferencia significativa.

En la tabla 7 se muestran los resultados del diámetro del halo y el porcentaje de inhibición de las bacterias en estudio, considerando al halo generado con gentamicina como referencia, frente al extracto crudo proveniente de las semillas de sangorache.

Tabla 7

Tamaño de halos de inhibición de bacterias patógenas frente al extracto crudo

Tratamiento	Bacteria Patógena	Diámetro del halo de inhibición (mm)	(%) de inhibición
T1	<i>Serratia marcescens</i>	0,00	0,00
T2	<i>Escherichia coli</i>	0,00	0,00
T3	<i>Streptococcus</i> grupo C y G	0,00	0,00
T4	<i>Micrococcus luteus</i>	0,00	0,00
T5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00	0,00

Nota: T1: *Serratia marcescens* +extracto crudo; T2: *Escherichia coli* + extracto crudo; T3: *Streptococcus* grupo C/G+ *extracto crudo*; T4: *Micrococcus luteus*+ extracto crudo; T5: *Pseudomonas aeruginosa* + extracto crudo.

Elaborado por: (Las autoras, 2019)

En los tratamientos desde T1 a T5 se obtuvo una respuesta negativa, ya que no hubo presencia de halos de inhibición, en todos los casos el crecimiento bacteriano fue homogéneo sobre la superficie de la caja Petri.

Esto pudo ocurrir debido a que el extracto crudo tiene algunos tipos de proteínas y no únicamente las de interés, como es el caso de los inhibidores de tripsina con potencial actividad antimicrobiana. Entre los componentes extraíbles en mayor proporción de las semillas de sangorache además de inhibidores de proteasas están varias clases de proteínas como: albuminas, globulinas y prolinas con posibles aplicaciones biotecnológicas (Janssen, y otros, 2016).

En el trabajo desarrollado por García Silva (2015) donde evaluó la actividad antibacteriana de extractos lipídicos, etanólicos y de flavonoides del género *Amaranthus* concuerda en

una respuesta de resistencia de algunas bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus flavus*, ya que un extracto proveniente de una matriz vegetal presenta algunos componentes que pueden o no aportar con su potencial biológico.

La respuesta determinada en este ensayo está ligada a los mecanismos de defensa que las bacterias suelen presentar para asegurar la colonización total de un entorno. Se conoce que las respuestas pueden ser extracelulares o intracelulares dependiendo del nivel de estrés al que son sometidas en algunos casos frente a antimicrobianos (Cappuccino & Welsh, 2017). En algunas bacterias pueden generar resistencia a los péptidos antimicrobianos, con la producción de una cápsula, en este mecanismo los polisacáridos capsulares pueden actuar como barrera, bloqueando las interacciones entre las membranas bacterianas y los péptidos antimicrobianos (Sánchez, 2016).

Otro mecanismo de resistencia de las bacterias son las bombas de expulsión, encargadas de transportar al antimicrobiano del espacio periplásmico y expulsarlo al exterior de la bacteria para que no llegue al sitio de acción, dichas bombas de salida pueden ser específicas (codificadas en plásmido) o inespecíficas (expresadas en el cromosoma bacteriano), común en bacterias Gram negativas (Tafur, Torres, & Villegas, 2008).

En la tabla 8 se muestran los resultados del diámetro del halo y el porcentaje de inhibición de las bacterias en estudio, considerando al halo generado con gentamicina como referencia, frente al extracto semipurificado proveniente de las semillas de sangorache.

Tabla 8

Tamaño de halos de inhibición de bacterias patógenas frente al extracto semipurificado

Tratamiento	Bacteria Patógena	Diámetro del halo de inhibición (mm)	(%) de inhibición
T6	<i>Serratia marcescens</i>	7,00	30,43
T7	<i>Escherichia coli</i>	14,57	53,25
T8	<i>Streptococcus</i> grupo C/G	11,33	40,96
T9	<i>Micrococcus luteus</i>	7,00	18,42
T10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00	0,00

Nota: T6: *Serratia marcescens* +extracto semipurificado; T7: *Escherichia coli* + extracto semipurificado; T8: *Streptococcus* grupo C y G+ extracto semipurificado; T9: *Micrococcus luteus*+ extracto semipurificado; T10: *Pseudomonas aeruginosa* + extracto semipurificado.

Elaborado por: (Las autoras, 2019)

Los tratamientos T7 y T8 presentaron halos de inhibición de mayor diámetro alrededor de la zona del disco embebido con extracto semipurificado, esto se puede observar también en la figura 4, en comparación con el tamaño de los halos de T6 y T9. Sin embargo, el porcentaje de inhibición comparado con gentamicina indica que frente a todas las bacterias excepto *Pseudomonas aeruginosa* (T10) existe un resultado favorable.

Tratamiento 7

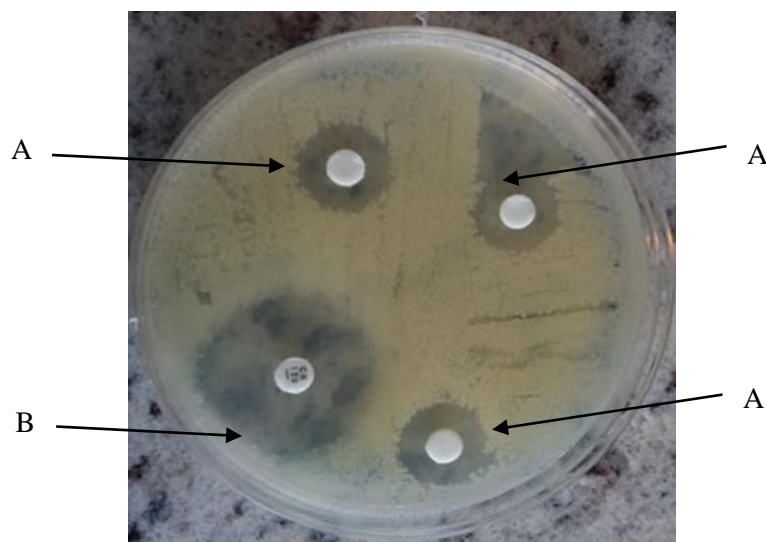
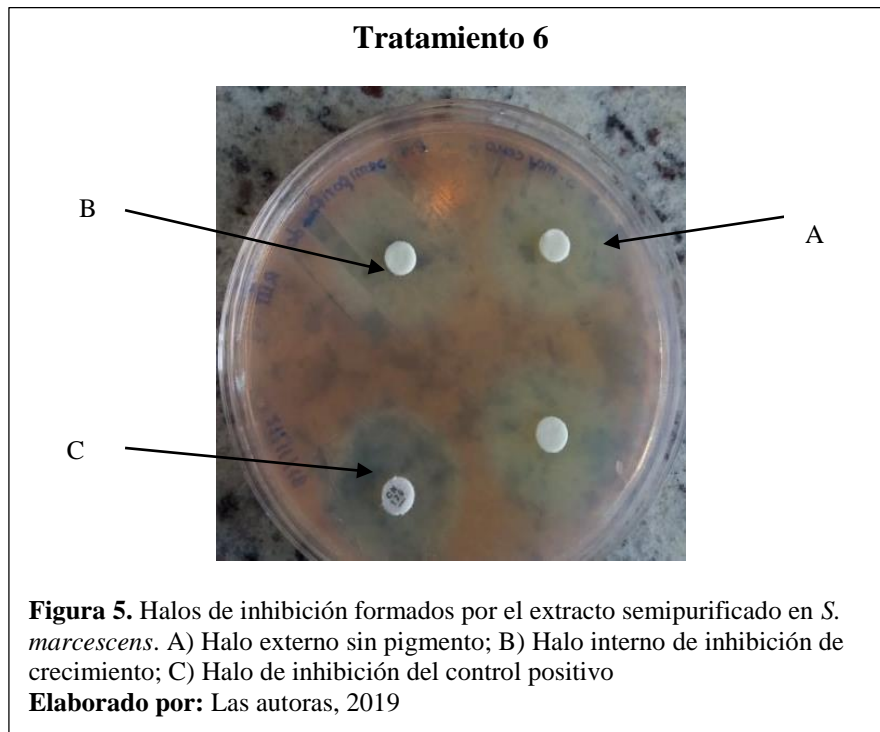


Figura 4. Halos de inhibición formados por el extracto semipurificado en *E. coli*. A) Halos de inhibición de crecimiento frente al extracto; B) Halo de inhibición frente al control positivo

Elaborado por: Las autoras, 2019

En este ensayo presentó inhibición tanto en bacterias Gram negativas como positivas, puesto que la mayoría de los PAMs combaten a las bacterias mediante una interacción electrostática entre cargas positivas de los péptidos y negativas de las membranas bacterianas. La carga negativa de esta estructura se origina por las sustancias que la conforman, en Gram negativas por el contenido de lipopolisacáridos y fosfolípidos, y ácido teicoico en Gram positivas (Rivillas, 2008).



En función de los porcentajes de inhibición de crecimiento reportados, los tratamientos T6 y T9 fueron los más bajos con un 18,42 % y 30,43% respectivamente evidenciando la resistencia de las cepas frente al extracto proteico. En base a reportes médicos de pacientes inmunodeprimidos las infecciones generadas por cepas de *Serratia* aumentan su virulencia por la producción de enzimas carbapenasas, transmitidas a nivel cromosómico o mediante plásmidos a su descendencia, cuya función es restringir la acción de antimicrobianos y antibióticos (Hopkins, y otros, 2017).

Con respecto al contraataque de algunas cepas como *Micrococcus luteus* ante la presencia del extracto semipurificado pudo deberse al nivel de refinamiento de las proteínas del extracto para lograr el efecto antimicrobiano esperado, pues no todas las bacterias poseen las mismas características fisiológicas.

La ausencia de halos como en T10 pudo estar relacionada con un sistema de señalización a través de moléculas, *quorum sensing*, descrito en el estudio de LaSarre & Federle (2013), mediante el cual se comunican las bacterias para expandir una señal de alarma, similar a una arquitectura de circuito generando cambios en la expresión genética con el objeto de asegurar la sobrevivencia; este sistema ha sido identificado en algunas cepas Gram positivas y negativas.

Del mismo modo en la tabla 9 se muestran los resultados del diámetro del halo y el porcentaje de inhibición de las bacterias en estudio, considerando al halo generado con gentamicina como referencia, frente al extracto purificado proveniente de las semillas de sangorache.

Tabla 9

Tamaño de halos de inhibición de bacterias patógenas frente al extracto purificado

Tratamiento	Bacteria patógena	Diámetro del halo de inhibición (mm)	(%) de inhibición
T11	<i>Serratia marcescens</i>	8,57	25,67
T12	<i>Escherichia coli</i>	13,80	46,97
T13	<i>Streptococcus</i> grupo C y G	11,67	49,30
T14	<i>Micrococcus luteus</i>	0,00	0,00
T15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00	0,00

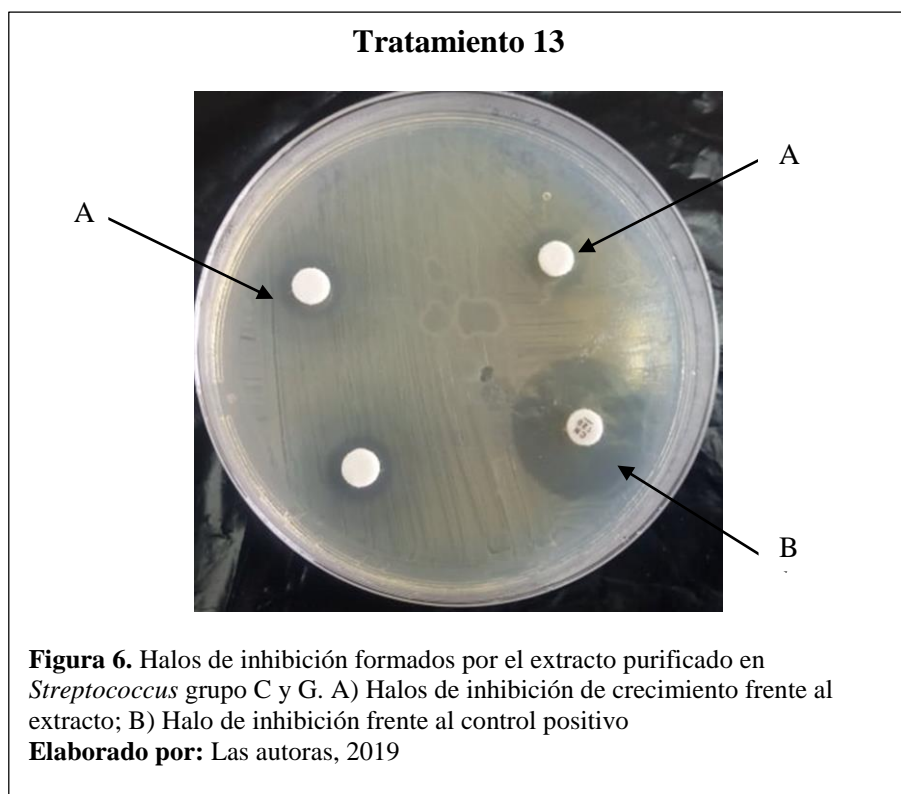
Nota: T11: *Serratia marcescens*+ extracto purificado; T12: *Escherichia coli* + extracto purificado; T13: *Streptococcus* grupo C/G+ extracto purificado; T14: *Micrococcus luteus*+ extracto purificado; T15: *Pseudomonas aeruginosa* + extracto purificado.

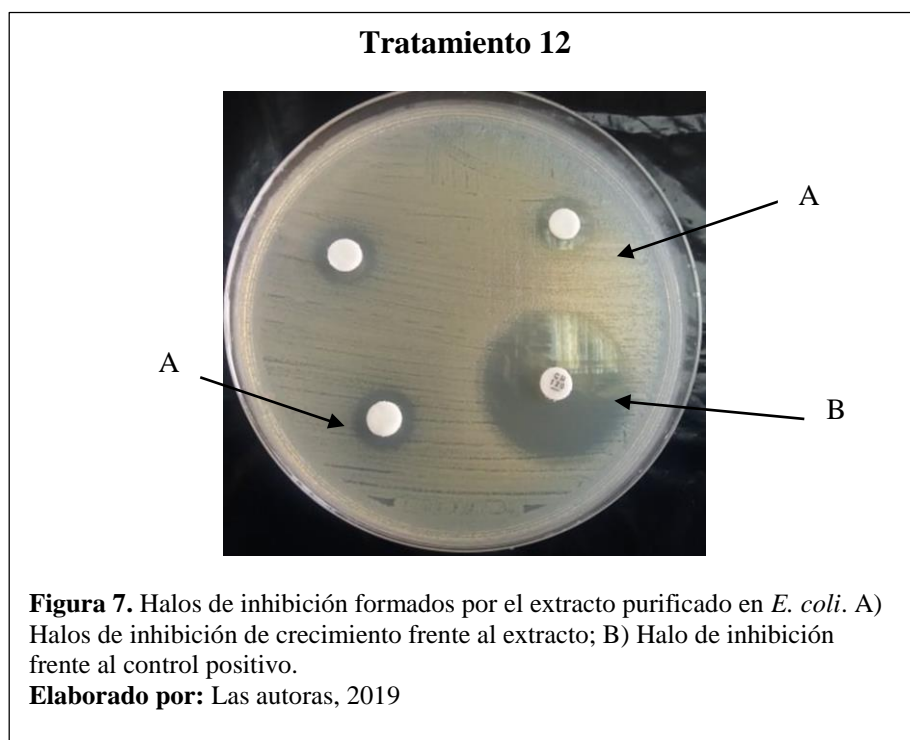
Elaborado por: (Las autoras, 2019)

T12 y T13 fueron los tratamientos que presentaron los halos de inhibición de mayor diámetro a diferencia de T11 que presento halos de menor tamaño, pero al igual que con

el extracto semipurificado presento un halo externo en donde el color rojizo característico de la cepa estuvo ausente como se visualiza en la Figura 8.

El porcentaje de inhibición determinado para los extractos semipurificado y purificado en relación con gentamicina frente a *E. coli* fueron de 53,25 % y de 46,97 % respectivamente estas respuestas denotan la actividad biológica de los extractos de sangorache siendo este un estudio preliminar en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos.





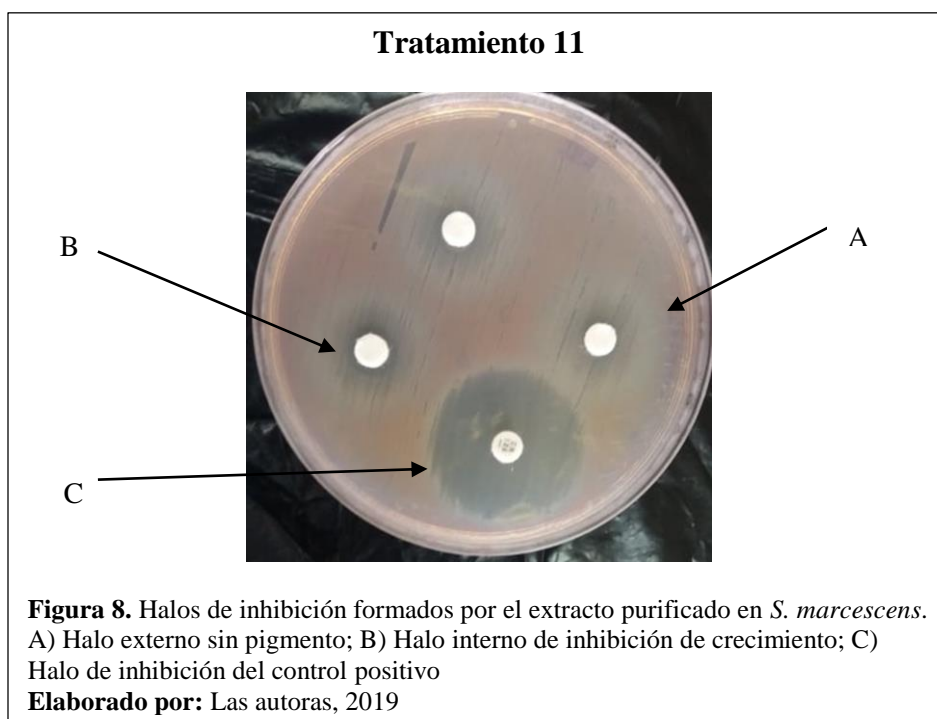
Varios son los estudios acerca de los serotipos del género *Streptococcus* que presentan capacidad para evadir agentes antibióticos, no obstante, los resultados determinados en T13 y T8 muestran la posibilidad de incluir a los péptidos antimicrobianos con capacidad inhibidora de tripsina en la lista de sustancias con futuras aplicaciones biomédicas (Rodríguez P. , 2017). Por lo que los extractos semipurificado y purificado sería una alternativa para combatir la resistencia el género *Streptococcus* del grupo B ya que poseen un mecanismo de resistencia a PAMs, en el cual la D-alanilación altera la conformación de los ácidos teicoicos, lo que provoca que la pared celular se haga más densa y reduzca la penetración de péptidos antimicrobianos catiónicos (Sánchez, 2016).

La inhibición del crecimiento en T12 difiere de los resultados registrados por Orosco (2013) en los mismos que no hubo inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* en presencia de extractos de amaranto negro (sangorache), esto se atribuyó a un proceso

previo de calentamiento de los extractos, que quizá altero las estructuras proteicas anulando su actividad biológica. En el caso de los tratamientos T14 y T15 la respuesta fue negativa el desarrollo de las cepas fue normal, sin mostrar ningún tipo de inhibición o alteración en el contorno de los discos embebidos con el extracto purificado de las semillas de sangorache.

Bajo la misma metodología aplicada en este estudio, Abro y otros (2016) indicaron que una cepa de *Micrococcus luteus* aislada de fluidos congelados de mamíferos no fue inhibida por agentes antibacterianos convencionales como gentamicina y ampicilina siendo un riesgo inminente para el desarrollo de enfermedades.

El tratamiento T11 presento halos de menor tamaño, en este tratamiento al igual que en T6 se presentó un halo externo en donde el color rojizo característico de la cepa estuvo ausente como se visualiza en la figura 8.



Según Di Venanzio (2014) en el género *Serratia* se puede observar dos tonalidades de pigmentación, un pigmento con tonalidad amarillenta anaranjada en medios con presencia de agua por efecto de la respiración bacteriana y otra tonalidad rojo intenso dependiente de los nutrientes del medio de cultivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos *Pseudomonas aeruginosa* no presentó una respuesta positiva a la inhibición frente a ninguno de los tres extractos proteicos, esto puede deberse a la presencia de porinas en su pared celular; estructuras proteicas responsables de la permeabilidad de moléculas y de la resistencia antibiótica (Leboffe & Pierce, 2010). Además *P. aeruginosa* activa sistemas regulatorios PhoP, PhoO y PmrA-PmrB en presencia de péptidos antimicrobianos, que provoca la activación de enzimas responsables para las modificaciones de lipopolisacáridos, lo que provoca resistencia a los inhibidores de tripsina (Sánchez, 2016).

En el estudio de Yusuf, y otros (2017) indica que la resistencia frente a antipseudomonales administrados a pacientes de una unidad de cuidados intensivos, dependería de un sistema de bombas de expulsión de antibióticos que tiene las bacterias conocido como *impermeability mediated resistance*, llegando a la conclusión que los criterios médicos deben evaluar los cambios que los pacientes presentan luego de 48 horas de exposición a un determinado medicamento.

En la tabla 10 se muestra el análisis estadístico desarrollado en el programa informático *InfoStat* con el que se determinó las diferencias significativas entre los tratamientos y en comparación al testigo.

Tabla 10**Cuadro de Análisis de Varianza de la prueba de sensibilidad**

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medios	F	p-valor
Bacteria	295,41	4	73,85	60,36	<0,0001
Extracto proteico	7039,34	3	2346,45	1917,81	<0,0001
Bacteria*Extracto	639,73	12	53,31	43,57	<0,0001
Error	48,94	40	1,22		
Total	8023,43	59			

Elaborado por: Las autoras, 2019

La tabla 10 indica que el nivel de significancia para los dos factores de estudio y su interacción es menor a 0,05; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, es decir, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición de las bacterias patógenas producido por los niveles de pureza de los extractos proteicos. La relación entre la capacidad para inhibir a tripsina de los extractos y la actividad antimicrobiana fue positiva, pues los extractos semipurificado y purificado inhibieron el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus* grupo C y G y *Serratia marcescens*.

En las tablas 11 y 12 se encuentran el análisis de las pruebas Tukey 5 % en referencia a las cinco cepas de bacterias del estudio y los extractos evaluados.

Escherichia coli fue la bacteria que menor resistencia presentó, ya que su crecimiento fue inhibido por dos de los tres extractos proteicos, esto podría indicar que los extractos fueron capaces de contrarrestar sus mecanismos de resistencia, como lo indican Téllez y Castaño (2010) en base a la acción de algunos péptidos sobre el plegamiento de las proteínas bacterianas, mediante la inhibición de chaperonas específicas, como DnaK en *E. coli*. Mientras que *Pseudomonas aeruginosa* fue la bacteria que mayor resistencia presentó, ya

que ninguno de los extractos proteicos inhibió su crecimiento, con una manifestación de cambio de color al medio de cultivo; este cambio es un rasgo del orden *Pseudomonadales* en medios deficientes de hierro aparece un pigmento en la superficie, para la especie en ensayo el pigmento es azul verdoso observado durante la experimentación (Leboffe & Pierce, 2010).

Tabla 11

Prueba de comparación Tukey de los halos observados de las bacterias en estudio.

Bacteria	Medias	E. E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,08 ^a	0,32
<i>Micrococcus luteus</i>	9, 25 ^a	0,32
<i>Serratia marcescens</i>	10,64 ^b	0,32
<i>Streptococcus</i> grupo C y G	12,33 ^c	0,32
<i>Escherichia coli</i>	14,34 ^d	0,32

Nota: las letras en los superíndices indica las diferencias significativas entre medias.

Elaborado por: Las autoras, 2019

A continuación, en la tabla 12 se muestra la comparación entre la actividad antimicrobiana de los tres extractos y gentamicina reportada en los ensayos de sensibilidad frente a las cepas en estudio.

Tabla 12**Comparación estadística de la actividad antimicrobiana utilizando prueba Tukey**

Extracto	Medias	E. E
Crudo	0,00 ^a	0,29
Purificado	6,81 ^b	0,29
Semipurificado	7,98 ^c	0,29
Gentamicina	28,93 ^d	0,29

Nota: las letras en los superíndices indica las diferencias significativas entre medias.

Elaborado por: Las autoras, 2019

En la tabla 12 se puede observar que hubo diferencia significativa entre los tres extractos proteicos provenientes de semillas de sangorache. Siendo el extracto semipurificado el mejor, al tener una mayor media en relación con la medición de los halos. A pesar de no estar totalmente purificado este extracto presentó una mejor actividad antibacteriana, esto pudo haber ocurrido por la presencia de otras proteínas que potenciaron a esta actividad, como: albuminas, globulinas, prolaminas, gluelinas y prolinas (Janssen, y otros, 2016; Rivillas, 2008).

Otras sustancias consideradas probablemente como péptidos antimicrobianos como las antes mencionadas del extracto semipurificado de sangorache, están presentes en especies que comparten rasgos genéticos, esto se fundamenta en el estudio de Rivilla (2008), autor que encontró a *Amaranthus hybridus* (sangorache) como el ancestro común de las especies *Amaranthus hypocondriacus* (amaranto liso) y *Amaranthus caudatus* (ataco) al comparar las secuencias de los péptidos aislados de semillas de la primera especie Ay-AMP1 y Ay-AMP2 con las secuencias de péptidos Ac-AMP1 y Ac-Amp2 de la segunda

especie; llegando a determinar un 100 % de homología entre estas secuencias y las secuencias peptídicas conservadas a pesar de la domesticación de *A. hybridus*.

Al evaluar la interacción entre las bacterias y los extractos a través de la prueba Tukey cuya tabla se muestra en el *Anexo 9*, los mejores tratamientos fueron T7, T8, T12 y T13. El mejor tratamiento de todo el ensayo fue T7, ya que presentó una media con mayor valor tomada a partir de la variable evaluada frente al extracto semipurificado; sin embargo, las medias anotadas de los tratamientos con extractos semipurificado y purificado tuvieron valores entre 7,00 y 14,57 mm siendo esto un aporte importante acerca de la existencia de una actividad biológica adicional en estos extractos, al tener en cuenta que los mismos inhiben la actividad enzimática de tripsina. Según Acosta, Carpio, Vilcacundo y Carillo (2016) la pérdida o disminución de las propiedades biológicas de un extracto vegetal dependería del método de aislamiento inicial de moléculas de interés, para el caso de las proteínas, factores como la temperatura y pH son importantes durante este proceso para evitar su desnaturalización.

Aunque, en los tratamientos desde T18 hasta T20 correspondientes a gentamicina las medias fueron superiores y oscilaron entre 26,33 y 32,33 mm a diferencia de las medias recopiladas de los extractos proteicos obtenidos con capacidad inhibidora de tripsina, en este estudio se evidenció una actividad antibacteriana preliminar de estas sustancias proteicas cuyo origen es el metabolismo primario de las plantas, y es una ventaja puesto que la planta de sangorache no necesitaría estar en medio de estrés para producir estas sustancias (Peralta Idrovo, 2009). Por otra parte la efectividad de gentamicina podría estar relacionada a su estabilidad química, con un blanco de ataque específico a la subunidad 30S del ribosoma impidiendo la síntesis de proteínas en los microorganismos, que no es

afectada condiciones externas del medio como la humedad ambiental o la temperatura, a diferencia de los productos bioactivos que pueden ser aislados de diferentes fuentes naturales y presentan propiedades farmacológicas por la diversidad de estructuras químicas de sus componentes tienden a alterarse con mayor facilidad perdiendo sus propiedades (Rodríguez M. , 2002)

De forma cualitativa la respuesta obtenida en este estudio mediante la prueba de susceptibilidad con discos se muestra en la tabla 13.

Tabla 13

Categorización de la actividad antimicrobiana de forma cualitativa para las bacterias del estudio

Bacteria	Extracto crudo	Extracto semipurificado	Extracto purificado	Control positivo
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S
<i>Streptococcus grupo C/G</i>	R	R	R	S
<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	R	S
<i>Escherichia coli</i>	R	I	I	S

Nota: Las letras S (Sensible); I (Intermedia) y R (resistente) son las categorías de interpretación basadas en el CLSI (Instituto de Normas Clínicas de Laboratorio). **Elaborado por:** Las autoras, 2019

Se categorizó a las cinco cepas empleadas en la experimentación como sensibles al haber comparado la zona de inhibición del disco gentamicina, con los valores estipulados en las tablas del documento M 100 elaborado por el CLSI, lo cual difiere con el estudio de Díaz, Rodríguez & Zhurbenco (2010) en el que describió a cepas multiresistentes frente a aminoglucósidos como gentamicina, debido a la modificación de la estructura diana sobre la que actúa su principio activo en la bacteria, obligando al uso de otros antibióticos cuyo objetivo sea la pared celular para la sensibilización de las cepas.

También se comparó el tamaño de los halos de inhibición medidos en las pruebas antimicrobianas y las tablas del CLSI dentro de la categoría intermedia frente a los extractos semipurificado y purificado estuvo *Escherichia coli*; y las cepas de *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* grupo C y G y *Micrococcus luteus* estuvieron en la categoría de resistentes, pues frente a los tres tipos de extracto de sangorache el tamaño de sus halos fue inferior a los 12 mm al. La problemática sanitaria que podrían desencadenar estas cepas de patógenos oportunistas agrupados en la categoría resistente por su respuesta en este ensayo está sujeta a medidas preventivas como el mantenimiento de ambientes intrahospitalarios asépticos y la esterilización de los instrumentos médicos (Rubio, 2013).

La mejor alternativa para abrir el abanico de nuevos tratamientos en el área médica es el análisis de antimicrobianos naturales como extractos proteicos, etanólicos de plantas o exudados de animales que complementen a los tratamientos medicamentosos comunes y en un futuro lleguen a reemplazarlos (Caffini, 2016).

Conclusiones

Se determinó que los tres tipos de extractos proteicos de semillas de sangorache: crudo, semipurificado y purificado tienen capacidad inhibidora de tripsina con valores de 291,9; 327,4 y 363 mU/mL respectivamente, manifestando este último, mayor capacidad de inhibir a tripsina lo que podría ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión o la pancreatitis crónica.

Al evaluar la actividad antimicrobiana se determinó que hubo inhibición por parte de los extractos semipurificado y purificado frente a *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Streptococcus* grupo C y G, con una inhibición de su crecimiento entre 30 y 50 % en función a la capacidad de inhibición de gentamicina, estas respuestas son favorables para la actividad biológica de los extractos de sangorache siendo este un estudio preliminar en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos.

En base a los manuales del CLSI la cepa de *Escherichia coli* estuvo dentro de la categoría intermedia frente a los extractos semipurificado y purificado, a diferencia de las cepas de *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* grupo C y G y *Micrococcus luteus* fueron categorizadas como resistentes frente a los tres tipos de extracto de sangorache.

Las metodologías empleadas tanto para la obtención de extractos proteicos inhibidores de tripsina a partir de semillas de sangorache, como para evaluar su actividad antimicrobiana son eficaces por la facilidad de recopilación de resultados en corto tiempo y reproducibles tanto a escala de laboratorio como a nivel industrial.

El análisis de las semillas de sangorache en estudios sobre la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos es importante por las propiedades biológicas aprovechables que presentan, como antioxidante, por su capacidad para inhibir enzimas, y controlar el crecimiento de ciertas bacterias como se evidencia en este trabajo.

Recomendaciones

Desarrollar el estudio de inhibición de los extractos frente a otros microorganismos como: hongos, levaduras y otras bacterias patógenas con el propósito de complementar los resultados y potencializar el diseño de nuevos agentes antimicrobianos.

Realizar la obtención de extractos proteicos mediante una metodología diferente a la empleada en este trabajo con el fin de evaluar la variación de la capacidad inhibidora de las semillas de sangorache.

Monitorear durante la incubación los cambios de los microorganismos, cada dos horas y anotarlos para reportar datos acerca de la velocidad de crecimiento vs el tamaño del halo de inhibición o la pérdida de alguna característica morfológica en presencia de un posible antimicrobiano.

Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos frente a los microorganismos seleccionados a través de nuevas técnicas que permitan identificar grados de sensibilidad y factores de resistencia.

Glosario

Sangorache: planta de la región andina considerada patrimonio cultural ecuatoriano.

Catalizador: molécula encargada de aumentar o disminuir la velocidad de una reacción biológicos o sintéticos.

Sustrato: sustancia específica sobre la cual actúa una enzima.

Proteasas: biomoléculas que degradan péptidos o proteínas hasta formas más sencillas.

Inhibidor de proteasas: sustancias de cualquier tipo que puedan neutralizar total o parcialmente a una proteasa.

Tripsina: proteasa comercial utilizada en ensayos enzimáticos *in vitro*.

Inhibidores de tripsina: sustancias de cualquier tipo que puedan neutralizar totalmente a tripsina.

Dominios de kunitz: estructuras que intervienen en la inhibición de tripsina

Permeado: porción del extracto proteico que ha pasado por el poro de las membranas.

Retenido: extracto proteico depositado en la parte superior de la membrana luego de la centrifugación.

Actividad inhibitoria: estado en el cual se puedan anular la formación del complejo enzima sustrato.

Frita: material obtenido por la fusión de compuestos minerales altas temperaturas empleado para el tamizaje de líquidos.

Ultrafiltración: técnica empleada para la separación de mezclas a través de membranas.

Sepharosa: material granulado y poroso empleado en el confinamiento de tripsina.

Tripsina-glioxil-sepharosa: matriz de inmovilización con brazo espaciador.

Glicidol: reactivo empleado en la formación de un brazo espaciador en la inmovilización de tripsina.

Elución: procedimiento por el cual se recuperan todos los componentes de una mezcla en cromatografía de columna.

Tisanas: preparaciones con efectos farmacológicos a partir de matrices vegetales.

Método M02: técnica para medir la sensibilidad *in vitro* de bacterias frente a antimicrobianos o antibióticos.

Tubo pico de flauta: disposición inclinada de agar en tubos para la siembra y conservación de microorganismos.

Patogenicidad: hace referencia a la capacidad de generar enfermedades de los microorganismos.

Abreviaturas

IPs:	inhibidores de proteasas
PAMs:	péptidos antimicrobianos
BApNA:	N- α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida)
mU/mL:	miliunidades enzimáticas por mililitro
AI:	actividad inhibidora
AE:	actividad enzimática
U/mL:	unidades enzimáticas por mililitro
TSB:	<i>Tryptic Soy Borth</i>
TSA:	<i>Trypticase Soy Agar</i>
CLSI:	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio

Referencias

- Abro, H., Abro, R., Rind, R., Kamboh, A., Memon, A., Channa, A., . . . Wagan, B. (2016). Antibioqram of the *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus intermedius* isolated from the bovine frozen semen. *Pure and Applied Biology*, 5(2), 204.
- Acosta, C., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrilo, W. (2016). Identification of proteins isolate from amaranth (*Amaranthus caudatus*) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with water and NaCl 0.1 M solvents. *Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9, 331-333.
- Adhikary, D., & Pratt, D. (2015). Morphologic and taxonomic analysis of the weedy and cultivated *Amaranthus hybridus* species complex. *Systematic Botany*, 40(2), 604-610.
- Aguilar, M., Valadez, M., & Cuellar, M. (2005). Identificación de Compuestos Antinutricionales en Amaranto (Integro y Reventado) Cultivado en Algunas Regiones del Centro del País. *VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Guanajuato.
- Alburquerque, D., Zapata, M., Bermúdez, L., & Leiva, S. (2018). Determinación de la actividad inhibidora de proteasas del extracto acuoso de los organos vegetativos y reproductivos de *Ismene amancaes* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) "amancaes" endémica del Perú. *Arnaldoa*, 25(1), 273-286.
- Alvarado, J. (2011). *El amaranto propiedades, usos y aplicación en la gastronomía*. (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca. Cuenca.

- Arboleda, D. (2011). *Jerarquía estructural de las proteínas*. San Vicente : Club Universitario.
- Benavides, G., & Hermida, A. (2008). *Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca)*. Bogotá: (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Breitenbrash, C. (2013). *Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae*. Sao Paulo: Nova Science Publishers.
- Cabral, H., Dorantes, J., Calva, G., Lucho, C., & Beltran, R. (2018). Inmovilización de enzimas. *Boletín Científico del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería*, 7-8.
- Caffini, N. (2016). Potenciales aplicaciones farmacológicas de los inhibidores de proteasas de origen vegetal. *Revista Farmacéutica*, 15-24.
- Camacho, M. (2012). *Caracterización estructural de metabolitos secundarios de Capparis ovalifolia*. (Tesis de Pregrado), Pontificia Univeresidad Católica del Perú. Lima.
- Campobell, M., & Farrell, S. (2016). *Bioquímica*. México: CENAGE Learning.
- Candiotto, F., Freitas, A., Neri, R., Bezerra, R., Rodrigues, R., Sampaio, L., & Tesser, M. (2018). Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Brazilian Journal of Biology*, 78(2), 281-288.
- Cappuccino, J., & Welsh, C. (2017). *Microbiology a Laboratory Manual*. Malasia: Pearson .

- Casablancas, G., Lopez, J., Alvero, C., González, G., La Fuente, F., Rodicio, J., . . . Valero, F. (2005). *Ingeniería Bioquímica*. Vallehermoso: SINTESIS.
- Castillo, P., Quinchuela, L., Echeverría, P., & Jácome, G. (2017). Extracción purificación y caracterización de inhibidores de tripsina provenientes de semillas andinas. *Enfoque UTE*, 8(4), 53-67.
- Cisneros, S. (2017). *Inhibidores peptídicos de proteasas obtenidos a partir de papas andinas como potenciales conservantes en la industria alimenticia*. (Tesis doctoral). Universidad de la Plata. Argentina.
- CLSI. (2018). *M100S Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- Correa, K., Bravo, M., Silva, R., & Montiel, M. (2015). Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad de Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 83-88.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, 156-160.
- Costa, M., Silveira, D., & Lucena, H. (2015). Membranas cerâmicas assimétricas tubulares: influência do tempo de deposição da cfiltrante na morfologia das membranasamada. *MATERIA*, 335-343.
- Dabhade, A., Mokahe, N., & Patil, U. (2016). Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv. *Process Biochemistry*, 51(5), 659-674.

- De Lera, A. (2011). *Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa*. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco.
- Di Venanzio, G. (2014). *Mecanismos de patogénesis de Serratia marcescens*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- Díaz, J., & Juárez, M. (2007). *Bioquímica Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida*. Punta Santa Fe: Mc Graw Hill.
- Díaz, M., Rodríguez, C., & Zhurbenco, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Echeverría, P. (2014). *Extracción y caracterización de inhibidores de tripsina provenientes de semillas andinas*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito.
- Elizalde, A., Porilla, Y., & Chaparro, D. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7(1), 46-53.
- Errasti, M. (2013). *Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina*. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/31727/Documento_completo___Errasti.pdf?sequence=1
- Escudero, I. (2017). *Implicación de las metaloproteasas en el envejecimiento cardiovascular*. Madrid.

- Fajardo, S., & Criollo, P. (2010). *Valor nutritivo y funcional de la harina de Sangorache (Amaranthus hybridus)*. (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca. Cuenca.
- Fernández, M., & del Pozo, J. (2018). Protocolo diagnóstico de las infecciones por estreptococos de los grupos C y G. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(49), 2915-2917.
- García Silva, D. (2015). *Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas de género Amaranthus aplicado sobre cepas de interés clínico en el período diciembre de 2013 - mayo de 2014*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba.
- García, C. (2014). *Inhibidores de proteasas en leguminosas* . (Tesis de pregrado). Universidad de Valladolid, España. Obtenido de (Tesis de pregrado). Universidad de Valladolid, España.
- Garcia, M. (2013). *Extracción e inmovilización de enzimas proteolíticas de tres tipos de frutas mediante dos métodos y su aplicación en la industria alimentaria, en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal de Bolívar*. (Tesis de pregrado). Universidad Estatal de Bolívar. Bolívar. Obtenido de <http://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/927/1/062.pdf>
- García, R., Salas , E., Del Monte A, Del Rivero , A., Guerra, Y., & Chávez, M. (2009). Micro y nanobiotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico. *Revista Cubana de Física*, 26(1).

- Gómez, A. (2013). *Selección de un proceso de transformación para la disminución de compuestos antinutricionales en el grano y las hojas de amaranto (Amaranthus caudatus L.) y sangorache (Amaranthus hybridus L.* (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito.
- González, M., San Juan, J., Morales, E., & Otero, A. (2017). Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(2).
- Guani, E., Santos, T., Lugo, S., & Terán, L. (2010). Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health disease. *Clinical Immunology*, 135(1), 1-11.
- Hale, J., & Hancock, R. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 5.
- Hegvi, E., & Sahin-Tóth, M. (2017). Genetic risk in chronic pancreatitis: the trypsin-dependent pathway. *Digestive diseases and sciences*, 62(7), 1692-1701.
- Hernandez, M., Castillo, P., Muñoz, F., Quinchuela, L., Echeverría, P., Jacome, G., . . . Aviles, F. (2014). Isolation and purification of protease inhibitors from Latin-American plants. *BIOPLANTS*, 57-58.
- Hopkins, K., Findlay, J., Meunier, D., Cummis, S., Kustos, I., Mustafa, N., . . . Woodford, N. (2017). *Serratia marcescens* producing SME carbapenemases: an emerging resistance problem in the UK? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(5), 1535-1537.

- Janssen, F., Anneleen, P., Rombouts, I., Janssens, K., Lomme, D., & Delcuor, J. (2016). Proteins of amaranth (*Amaranthus* spp.), buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and quinoa (*Chenopodium* spp.): A food science and technology perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 39-58.
- Kennelly, P., & Rodwell, V. (2007). Enzimas: Mecanismo de acción. En R. Murray, & V. Rodwell, *Harper-Bioquímica Ilustrada* (págs. 55-65). México: Manual Moderno.
- LaSarre, B., & Federle, M. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 77(1), 73-111.
- Leboffe, M., & Pierce, B. (2010). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory* (Fourth ed.). Colorado: Morton Publishing.
- Lehninger. (2005). *Bioquímica*. Madrid: Omega.
- Lopardo, H. (2013). Faringitis por estreptococos de los grupos C y G. *Medicina (Buenos Aires)*, 73(6), 605-606.
- Mahlapuu, M., Hakansson, J., Ringstad, L., & Bjom, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2-7.
- Malavic, N., & Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 963-946.
- Marin, M., Medina, C., Salinas, H., Villacres, E., & Barria, M. (2014). Evaluación del efecto inmunoestimulante de extracto de *Amaranthus hybridus* y sus componentes en la activación de células linfoides. *Centro de Biotecnología*, 75-88.

- Martínez, O., & Martínez, E. (2006). Proteínas. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 1-14.
- Montes, M., & García, J. (2007). Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25, 14-20.
- Moreira, B., Batista, K., Castro, E., Lima, E., & Fernandes, K. (2015). A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. *Carbohydrate polymers*, 122, 69-76.
- Muñoz, F. (2011). *Aislamiento y purificación parcial de los inhibidores de tripsina presente en semillas leguminosas o gramíneas producidas en el Ecuador*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito.
- Murillo, A. (2015). Línea de Tiempo, mejoramiento genético de granos andinos de Ecuador quinua, chocho, amaranto y ataco. *Estación Experimental Santa Catalina*, 1-3.
- OMS. (15 de Febrero de 2018). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- Orosco, E. (2013). Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos. (Tesis de pregrado). Universidad de la Plata, Plata.
- Parizi, L., Ali, A., Tirloni, L., Oldiges, D., Sabadin, G., Coutinho, M., . . . Da Silva, I. (2018). Peptidase inhibitors in tick physiology. *Medical and Veterinary Entomology*, 129-144.

- Peralta Idrovo, E. (2009). Amaranto y Ataco: Preguntas y Respuestas. *Estación Experimental Santa Catalina*, 8.
- Peralta, E., Villacrés, E., Mazón, N., & Rivera, M. (2008). El ataco, sangorache o amaranto negro (*Amaranthus hybridus* L.) en Ecuador. *INIAP*, 4-55.
- Peralta, R., & Juarez, A. (2011). *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona: REVERTE.
- Quinchuela, L. (2013). *Inmovilización Covalente de la Tripsina en Sepharosa*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Politécnica, Quito.
- Rawlings, N. (2010). Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92(11), 1463-1483.
- Reza, M., Habibi, M., & Bouzari, S. (2019). Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*, 108, 56-67.
- Rivillas, L. (2008). *Aislamiento y purificación de péptidos antimicrobianos de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus**. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.
- Rodríguez, M. (2002). Aminoglucósidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 22(1), 20-30.
- Rodríguez, P. (2017). *Químicos naturales en Alimentos vegetales que atentan contra la inocuidad alimentaria*. (Tesis pregrado). Universidad Nacional de Trujillo. Perú.

- Rubio, D. (2013). *Estudio de la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano de los adhesivos autograbantes frente a gérmenes de la cavidad oral*. (Tesis de Pregrado). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Rusting, S., Boex, E., Reinbothe, C., Wettstein, D., & Reinbothe, S. (2018). The complex world of plant protease inhibitors: Insights into a Kunitz-type cysteine protease inhibitor of *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & integrative biology*, 11(1), 2-17.
- Salas, C., Badillo, J., Ramirez, G., & Oliver-Salvador, C. (2015). Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *BioMed Research International*, 1-11.
- Sánchez, M. (2016). Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos. *Revista de la Asociación de Bioquímica Argentina*, 80(1), 36-43.
- Stainer, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (2010). *Microbiología* (Segunda ed.). Barcelona: Reverté S.A.
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3), 217-226.
- Téllez, G., & Castaño, J. (2010). Péptidos Antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-67.
- Terlizzi, M., Gribaudo, G., & Maffei, M. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in microbiology*, 1566.

- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2017). *Introducción a la microbiología*. Barcelona: Panamericana.
- Tropicos. (12 de septiembre de 2018). *Amaranthus hybridus* L. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/1100008>
- Vasudam, D., Sreekumari, S., & Vaidyanathan, K. (2011). *Bioquímica*. México: Cuellar Ayala.
- Vázquez Conde, R., & Vázquez López, R. (2014). *Temas Selectos de Biología I* (Primera ed.). México D.F.: GRUPO EDITORIAL PATRIA.
- Vignoli, R. (2017). *Escherichia coli* patógeno extra intestinal (ExPEC): atributos de virulencia, epidemiología molecular y resistencia a antibióticos. (Tesis de Doctorado). PEDECIBA, Montevideo.
- Voet, D., & Voet, J. (1992). *Bioquímica*. Madrid: Omega.
- Yang, R., Zhang, G., Zhang, F., Li, Z., & Huang, C. (2018). Membrane permeabilization design of antimicrobial peptides based on chikungunya virus fusion domain scaffold and its antibacterial activity against gram-positive *Streptococcus pneumoniae* in respiratory infection. *Biochimie*, 146, 139-147.
- Yusuf, E., Van, B., Verbrugghe, W., Ieven, M., Goovaerts, E., Bergs, K., . . . Goossens, H. (2017). Emergence of antimicrobial resistance to *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: association with the duration of antibiotic exposure and mode of administration. *Annals of intensive care*, 7(1), 2-7.

Zurita, J. (2012). *Resistencia bacteriana en el Ecuador*. Quito: Pontifica Universidad Católica del Ecuador.

Anexos

Anexo 1

Descripción taxonómica de sangorache



Figura9. Inflorescencia de sangorache
Fuente: Las autoras, 2019



Figura10. Semillas de sangorache
Fuente: Las autoras, 2019

División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Caryophyllidae</i>
Orden:	<i>Caryophyllales</i>
Familia:	<i>Amaranthaceae</i>
Subfamilia:	<i>Amaranthoideae</i>
Género:	<i>Amaranthus</i>
Especie:	<i>Amaranthus hybridus</i> <i>L.</i>

Fuente: (Tropicos, 2018)

Anexo 2

Tabla 15.

Análisis mineral y proximal de granos de sangorache y amaranto blanco especies del género *Amaranthus*.

Propiedad (%)	Sangorache	Amaranto Blanco
Zinc (ppm)	44,00	42,00
Cobre (ppm)	10,00	9,00
Hierro(ppm)	68,00	90,00
Manganeso (ppm)	44,00	24,00
Magnesio	0,35	0,24
Sodio	0,04	0,01
Calcio	0,30	0,16
Fósforo	0,61	0,61
Fibra cruda	13,90	9,80
Potasio	0,60	0,60
Grasa	6,18	4,60
Humedad	13,70	11,40
Cenizas	3,58	4,60
E.L.N.	61,90	62,80
Proteína	14,30	18,70

Fuente: Modificado de (Peralta, Villacrés, Mazón, & Rivera, 2008).

Anexo 3.

Cálculo de la actividad enzimática de tripsina y de la actividad inhibidora del extracto purificado

$$AE = \frac{\Delta DO_{400}}{\Delta t} \times \frac{1000 \times Vt}{\epsilon \times L \times Ve}$$

$$AE = 0,014 \times \frac{1000 \times 3500}{8800 \times 1 \times 100}$$

$$AE = 0,38 \text{ U/mL}$$

$$AE = 386,67 \text{ mU/mL}$$

$$AI = 0,0119 \times \frac{1000 \times 3500}{8800 \times 1 \times 200}$$

$$AI = 23,66 \text{ mU/mL}$$

$$AI = (386,67 - 23,66) \text{ mU/mL}$$

$$AI = 363,01 \text{ mU/mL}$$

Anexo 4.

Cálculo de la concentración enzimática del extracto purificado






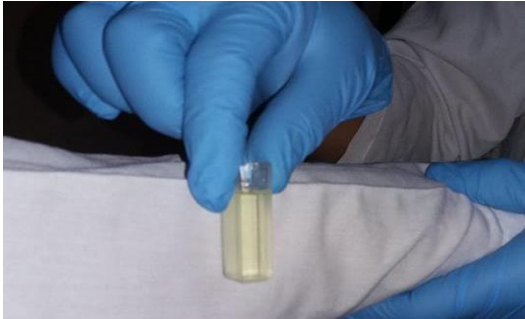
$$[P] = \frac{DO_{280} \times \frac{f}{L}}{\epsilon}$$

$$[P] = \frac{1,17}{1}$$

$$[P] = 1,17 \text{ mg/mL}$$

Nota: No fue necesaria la dilución de extracto para este caso por eso no se tomó en cuenta el $\frac{f}{t}$

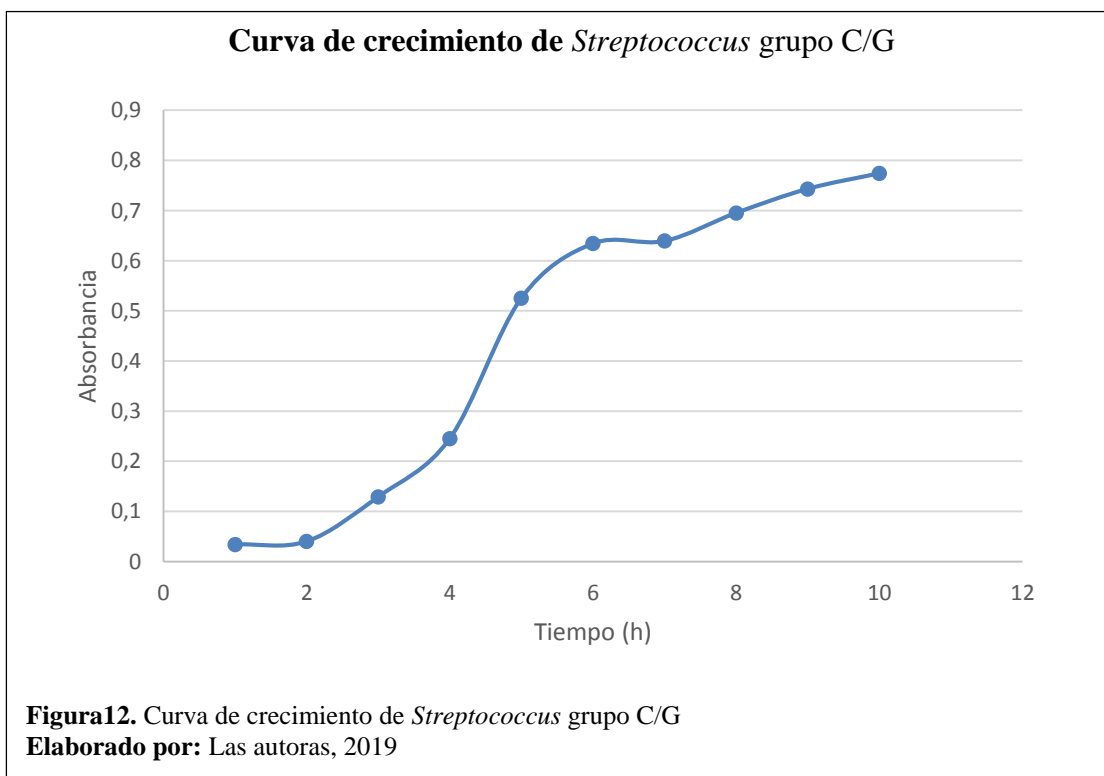
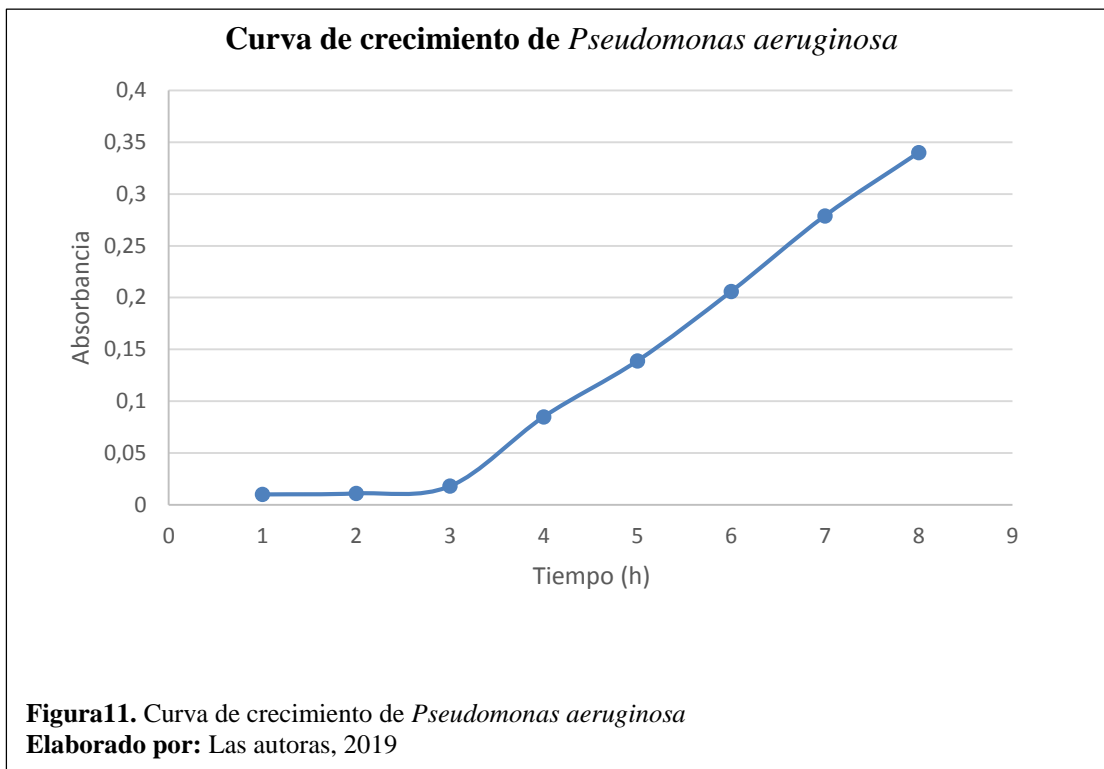
Anexo 5. Obtención de extractos crudo, semipurificado y purificado

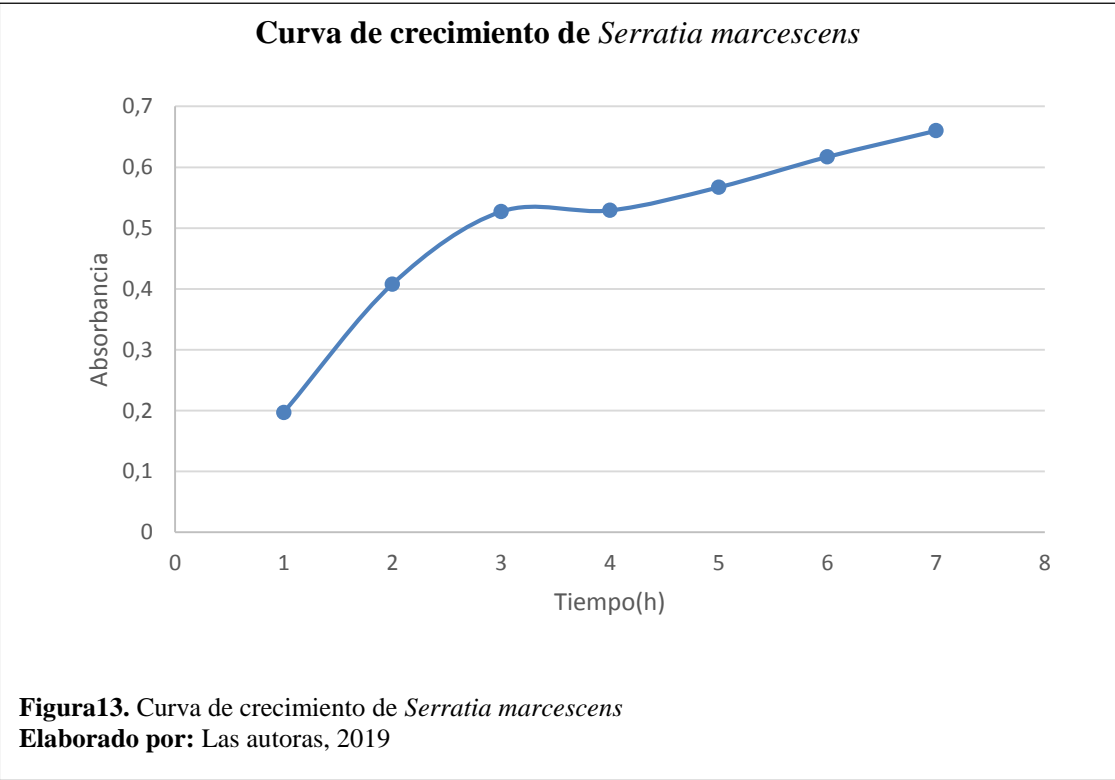
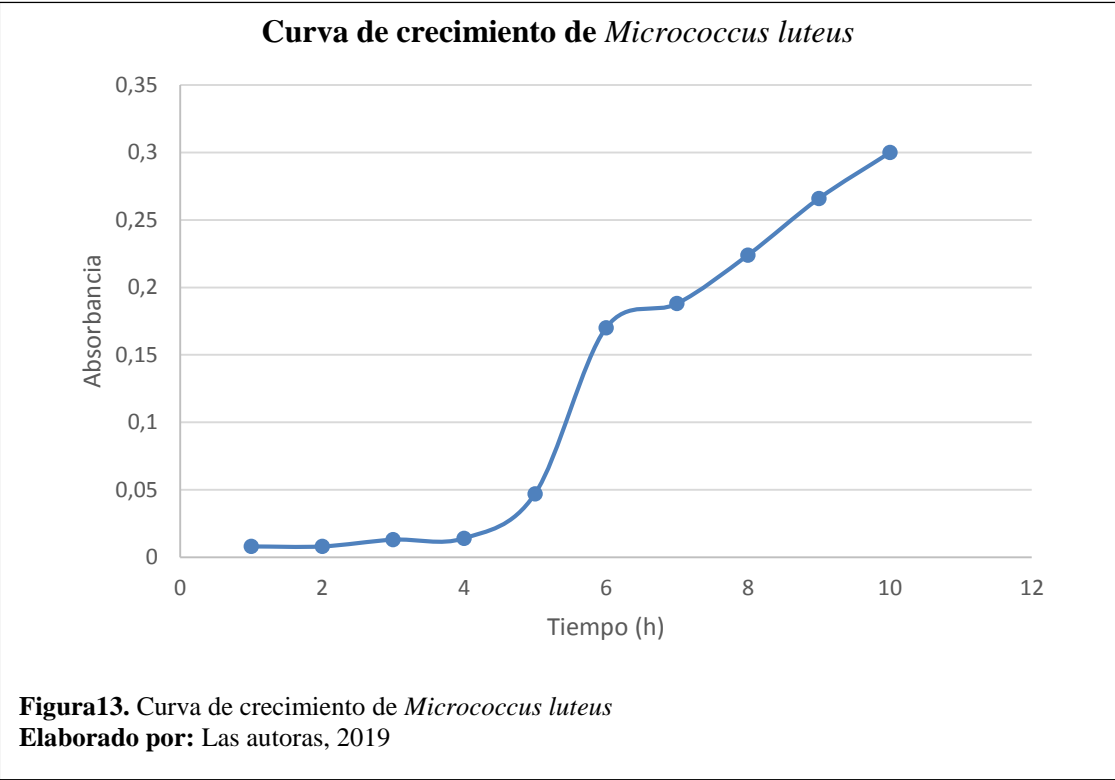
	
<p>Desengrasado de harina de sangorache</p>	<p>Harina de sangorache en tampón fosfato.</p>
	
<p>Tubos de centrifuga de Milipore</p>	<p>Extractos crudo y semipurificado</p>
	
<p>Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos</p>	<p>Reacción enzimática</p>

	
<p>Extracto semipurificado</p>	<p>Baño de hielo de la matriz</p>
	
<p>Empaquetamiento de la columna</p>	<p>Cromatografía de afinidad</p>
	
<p>Extracto purificado</p>	<p>Extracto liofilizado</p>

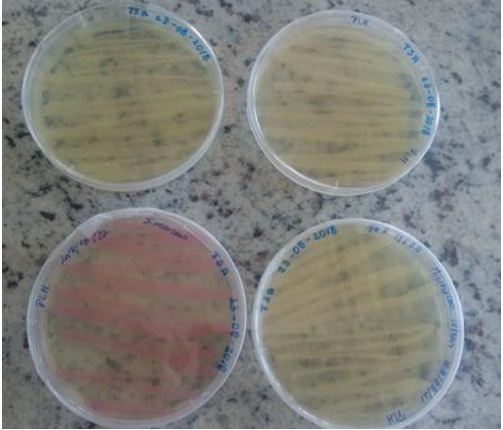




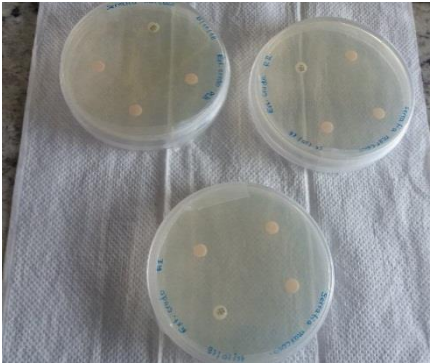
Elaborado por: Las autoras, 2019

Anexo 6. Curvas de crecimiento de las bacterias en estudio.





Anexo 7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos

	
<p>Patógenos oportunistas en estudio.</p>	<p>Escala Mac Farland 0,5</p>
	
<p>Reconstitución de extractos liofilizados</p>	<p>Siembra por hisopado</p>
	
<p>Preparación de discos con extracto</p>	<p>Antibiograma</p>

Elaborado por: Las autoras, 2019

Anexo 8. Tablas de comparación del método de sensibilidad de discos

Table 2A-1. Zone Diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Standards for *Enterobacteriaceae*

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)				MIC Interpretive Criteria (µg/mL)				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
AMINOGLYCOSIDES											
(30) WARNING: For <i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp., aminoglycosides may appear active <i>in vitro</i> but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.											
A	Gentamicin	10 µg	≥15	—	13–14	≤12	≤4	—	8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	—	13–14	≤12	≤4	—	8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	—	15–16	≤14	≤16	—	32	≥64	
O	Kanamycin	30 µg	≥18	—	14–17	≤13	≤16	—	32	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	—	13–14	≤12	≤8	—	16	≥32	
O	Streptomycin	10 µg	≥15	—	12–14	≤11	—	—	—	—	(31) There are no MIC interpretive standards.
MACROLIDES											
Inv.	Azithromycin	15 µg	≥13	—	—	≤12	≤16	—	—	≥32	(32) <i>Salmonella</i> Typhi only: Interpretive criteria are based on MIC distribution data.
TETRACYCLINES											
(33) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.											
C	Tetracycline	30 µg	≥15	—	12–14	≤11	≤4	—	8	≥16	
O	Doxycycline	30 µg	≥14	—	11–13	≤10	≤4	—	8	≥16	
O	Minocycline	30 µg	≥16	—	13–15	≤12	≤4	—	8	≥16	
QUINOLONES AND FLUOROQUINOLONES for <i>Enterobacteriaceae</i> except <i>Salmonella</i> spp. (Please refer to Glossary I.)											
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	—	16–20	≤15	≤1	—	2	≥4	
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	—	14–16	≤13	≤2	—	4	≥8	
O	Cinoxacin	100 µg	≥19	—	15–18	≤14	≤16	—	32	≥64	See comment (23).
O	Enoxacin	10 µg	≥18	—	15–17	≤14	≤2	—	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	—	15–17	≤14	≤2	—	4	≥8	
O	Gemifloxacin	5 µg	≥20	—	16–19	≤15	≤0.25	—	0.5	≥1	See comment (23).
O	Grepafloxacin	5 µg	≥18	—	15–17	≤14	≤1	—	2	≥4	
O	Lomefloxacin	10 µg	≥22	—	19–21	≤18	≤2	—	4	≥8	
O	Ofloxacin	5 µg	≥16	—	13–15	≤12	≤2	—	4	≥8	
U	Nalidixic acid	30 µg	≥19	—	14–18	≤13	≤16	—	—	≥32	(34) These interpretive criteria are for urinary tract isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> except <i>Salmonella</i> .
U	Norfloxacin	10 µg	≥17	—	13–16	≤12	≤4	—	8	≥16	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥19	—	16–18	≤15	≤2	—	4	≥8	

Table 2B-1. Zone Diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Standards for *Pseudomonas aeruginosa*

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
O	Piperacillin	100 µg	≥21	15–20	≤14	≤16	32–64	≥128	(5) Interpretive criteria for piperacillin (alone or with tazobactam) are based on a piperacillin dosage regimen of at least 3 g every 6 h.
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
A	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	15–20	≤14	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4	(6) Interpretive criteria for piperacillin (alone or with tazobactam) are based on a piperacillin dosage regimen of at least 3 g every 6 h.
B	Ceftolozane-tazobactam	30/10 µg	≥21	17–20	≤16	≤4/4	8/4	≥16/4	
O	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥24	16–23	≤15	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2	(7) Interpretive criteria for ticarcillin (alone or with clavulanate) are based on a ticarcillin dosage regimen of at least 3 g every 6 h.
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(8) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 6 h or 2 g every 8 h.
B	Cefepime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(9) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h or 2 g every 12 h.
MONOBACTAMS									
B	Aztreonam	30 µg	≥22	16–21	≤15	≤8	16	≥32	(10) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 6 h or 2 g every 8 h.
CARBAPENEMS									
B	Doripenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(11) Interpretive criteria for doripenem are based on a dosage regimen of 500 mg every 8 h.
B	Imipenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(12) Interpretive criteria for imipenem are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h or 500 mg every 6 h.
B	Meropenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(13) Interpretive criteria for meropenem are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h.
LIPOPEPTIDES									
O	Colistin	10 µg	≥11	—	≤10	≤2	4	≥8	
O	Polymyxin B	300 units	≥12	—	≤11	≤2	4	≥8	
AMINOGLYCOSIDES									
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13–14	≤12	≤8	16	≥32	

Fuente: (CLSI, 2018)

Anexo 9. Prueba Tukey 0,05 Bacterias-extractos.

Tabla 16.

Pruebas de comparación Tukey para interacción bacteria-extracto

Tratamiento	Medias	E.E
T1	0,00 ^a	0,64
T2	0,00 ^a	0,64
T3	0,00 ^a	0,64
T4	0,00 ^a	0,64
T5	0,00 ^a	0,64
T10	0,00 ^a	0,64
T14	0,00 ^a	0,64
T15	0,00 ^a	0,64
T6	7,00 ^b	0,64
T9	7,00 ^b	0,64
T11	8,57 ^{bc}	0,64
T8	11,33 ^{cd}	0,64
T13	11,67 ^{cd}	0,64
T12	13,80 ^d	0,64
T7	14,57 ^d	0,64
T18	26,33 ^e	0,64

T16	27,00 ^{ef}	0,64
T17	29,00 ^{efg}	0,64
T19	30,00 ^{fg}	0,64
T20	32,33 ^g	0,64

Elaborado por: Las autoras, 2019